

**Die SpsA-polymere Immunglobulin Rezeptor (plgR)  
Interaktion: Rolle des Hexapeptids des bakteriellen  
Adhäsins SpsA und der Ectodomänen D3 und D4  
des humanen plgR bei der Internalisierung von  
*Streptococcus pneumoniae* in Epithelzellen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von

**Dipl. Biol. Christine Elm**

aus Siegen

2004

1. Referent: apl. Professor Dr. G.S. Chhatwal

2. Referent: Professor Dr. D. Jahn

eingereicht am: 12.02.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 27.04.2004

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

Elm, C., Braathen, R., Bergmann, S., Frank, R., Vaerman, J.-P., Kaetzel, C.S., Chhatwal, G.S., Johansen, F.-E. & Hammerschmidt, S. Ectodomains 3 and 4 of human polymeric immunoglobulin receptor (hplgR) mediate invasion of *Streptococcus pneumoniae* into the Epithelium. Journal of Biological Chemistry 279 (8): 6296-6304 (2004).

Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J.-P., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S. Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hplgR). Indian J Med Res (2003).

### **Tagungsbeiträge:**

Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J.-P., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S.: The critical role of the hexapeptide binding motif of the pneumococcal SpsA/CbpA protein in the interaction with secretory component as revealed by surface plasmon resonance (SPR). (Poster) Europneumo, Siena (2002).

Elm, C., Rohde, M., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S.: Receptor-mediated adherence and endocytosis of *Streptococcus pneumoniae* into plgR-expressing epithelial cells is mediated by SpsA. (Vortrag) Jahrestagung der VAAM, Göttingen (2002).

Pracht, D., Elm, C., Seiler, M., Jenkinson, H.F. & Hammerschmidt, S.: Role of the pneumococcal virulence factor PavA on adherence and invasion. (Poster) Jahrestagung der DGHM, Dresden (2003).

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1 Zusammenfassung.....   | 1  |
| 2 Einleitung.....  | 2  |
| 2.1 Die Gattung <i>Streptococcus</i> .....   | 3  |
| 2.2 Die Art <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....  | 4  |
| 2.3 Krankheitsbild.....  | 6  |
| 2.4 Antibiotika-Resistenzen.....   | 8  |
| 2.5 Impfstoffe .....   | 9  |
| 2.6 Pathogenese .....  | 11 |
| 2.7 Virulenzfaktoren.....  | 14 |
| 2.8 Der polymere Immunglobulin-Rezeptor.....   | 21 |
| 2.9 Ziele dieser Arbeit.....   | 25 |
| 3 Ergebnisse.....  | 26 |
| 3.1 Interaktion des cholinbindenden Proteins SpsA mit SC/SlgA.....   | 26 |
| 3.1.1 SpsA vermittelte Adhärenz und Invasion an mukosale Epithelzellen...26  |    |
| 3.1.2 Expression des polymeren Ig-Rezeptors in humanen Epithelzellen.....30  |    |
| 3.1.3 Untersuchung zur Serotyp- und Stamm-spezifischen Adhärenz an plgR<br>produzierende Epithelzellen von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....32 |    |
| 3.1.4 Einfluss von Pneumolysin auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten<br>von Pneumokokken bei hplgR exprimierenden Epithelzellen.....34          |    |
| 3.1.5 Inhibition der Adhärenz an und Invasion von Pneumokokken in hplgR-<br>produzierende Zellen.....36  |    |
| 3.1.6 Anheftung von SpsA-beladenen Latexbeads an Epithelzellen.....39  |    |
| 3.1.7 Untersuchung der Transmigration von <i>Streptococcus pneumoniae</i><br>durch polarisierte hplgR produzierende Epithelzellen.....44           |    |
| 3.1.8 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transzytose.....46   |    |
| 3.1.9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Transzytose.....48  |    |
| 3.1.10 Inhibitionsversuche mit humaner SC und Antikörpern.....50   |    |
| 3.1.11 Spezies-spezifische Interaktion von SpsA mit plgR produzierenden<br>Zellen.....52   |    |

## Inhaltsverzeichnis

---

|  |        |
|--|--------|
| 3.2. Identifizierung des SpsA-Bindungsmotivs im humanen plgR.....  | 54     |
| 3.2.1 Bindung chimärer Maus-Human-SC-Moleküle an SpsA.....   | 54     |
| 3.2.2 Bindung chimärer SC-Moleküle mit humaner Domäne D3 und D4 an<br>SpsA.....                                      | 55     |
| 3.2.3 Identifizierung minimaler potenzieller SpsA-Bindungsmotive im<br>humanen plgR mittels Spotmembran-Analyse..... | 57     |
| 3.2.4 Inhibition der Adhärenz von Pneumokokken mit chimären SC-<br>Molekülen.....                                    | 59     |
| 3.2.5 Inhibitionsversuche in der Zellkultur mit synthetischen Peptiden.....  | 61     |
| 3.2.6 Untersuchungen zur SpsA-plgR vermittelten Adhärenz mit mutiertem<br>humanem plg Rezeptor.....                  | 65     |
| 3.2.7 Bindung von SpsA an mutierten humanen plgR mit Peptidpitopen der<br>Maus.....                                  | 67     |
| <br>4 Diskussion.....  | <br>70 |
| <br>5 Material und Methoden.....   | <br>85 |
| 5.1 Material.....  | 85     |
| 5.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> Stämme.....  | 85     |
| 5.1.2 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....  | 85     |
| 5.1.3 Nährmedien und Kulturbedingungen.....  | 86     |
| 5.1.4 Antibiotika.....   | 88     |
| 5.1.5 Antikörper.....  | 88     |
| 5.1.6 Enzyme.....  | 88     |
| 5.1.7 Lösungen und Puffer.....   | 89     |
| 5.1.8 Oligonukleotide.....   | 91     |
| 5.1.9 Vektoren und Plasmide.....   | 94     |
| 5.1.10 Molekularbiologische Kits.....  | 95     |
| 5.1.11 DNA-Längenstandard.....   | 95     |
| 5.2 Methoden zum Arbeiten mit DNA.....   | 96     |
| 5.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....   | 96     |
| 5.2.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....   | 96     |
| 5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....   | 96     |
| 5.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)                                       | 97     |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 5.2.5  | DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....                               | 97  |
| 5.2.6  | Enzymatische Reaktionen von Nukleinsäuren.....                     | 97  |
| 5.2.7  | Herstellung elektrokompeter Bakterien (Böttger, 1988).....         | 97  |
| 5.2.8  | Transformation von <i>E. coli</i> (Calvin und Hanawalt, 1988)..... | 98  |
| 5.2.9  | Transformation von <i>S. pneumoniae</i> .....                      | 98  |
| 5.2.10 | Pneumolysin-Test (Benton <i>et al.</i> , 1997).....                | 98  |
| 5.2.11 | Insertions-Duplikations-Mutagenese.....                            | 99  |
| 5.2.12 | Polymerase-Kettenreaktion (Saiki <i>et al.</i> , 1988).....        | 99  |
| 5.2.13 | PCR-Sequenzierung.....   | 100 |
| 5.2.14 | Site-directed-Mutagenesis.....                                     | 101 |
| 5.2.15 | Klonierung in Topo- oder pGEM- Vektor.....                         | 102 |
| 5.2.16 | Ligation.....  | 102 |
| 5.2.17 | Phenol-Chloroform Extraktion.....                                  | 102 |
| 5.2.18 | Phenol-Diethylether Extraktion.....                                | 102 |
| 5.2.19 | Dephosphorylierung.....  | 103 |
| 5.2.20 | Ethanol-Fällung.....   | 103 |
| 5.2.21 | Digoxigenin (DIG)-Markierung mittels PCR.....                      | 103 |
| 5.3    | Methoden zum Arbeiten mit RNA.....                                 | 103 |
| 5.3.1  | Isolierung der RNA aus Pneumokokken.....                           | 103 |
| 5.3.2  | Isolierung der RNA aus Zellen.....                                 | 104 |
| 5.3.3  | Isolierung der mRNA aus der gesamt-RNA.....                        | 104 |
| 5.3.4  | Northern-Blot.....   | 104 |
| 5.3.5  | Spezifischer Nachweis von RNA durch DIG-markierte Sonden.....      | 105 |
| 5.3.6  | Herstellung von cDNA durch reverse Transkription.....              | 105 |
| 5.3.7  | PCR-Amplifikation von cDNA.....                                    | 105 |
| 5.4    | Methoden für das Arbeiten mit Proteinen.....                       | 106 |
| 5.4.1  | Herstellung von Bakterienlysaten.....                              | 106 |
| 5.4.2  | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....           | 106 |
| 5.4.3  | Protein Größenstandard.....  | 107 |
| 5.4.4  | Coomassie-Färbung.....   | 107 |
| 5.4.5  | Immunoblot.....  | 107 |
| 5.4.6  | Dot-spot-Analyse.....  | 108 |
| 5.4.7  | Spot Membran Analyse.....  | 108 |
| 5.4.8  | Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> .....                   | 109 |

## **Inhaltsverzeichnis**

---

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 5.4.9  | Aufreinigung von Histag-Fusionsproteinen über Ni-NTA-Agarose..... | 109 |
| 5.4.10 | IgG-Aufreinigung.....   | 109 |
| 5.4.11 | Dialyse.....  | 110 |
| 5.4.12 | Proteinsequenzanalyse.....  | 110 |
| 5.5    | Methoden für das Arbeiten mit Zelllinien.....                     | 110 |
| 5.5.1  | Zelllinien und Medien.....  | 110 |
| 5.5.2  | Kultivierung der Zelllinien.....                                  | 111 |
| 5.5.3  | Kultivierung der Zellen im Transwellsystem.....                   | 112 |
| 5.5.4  | Konservierung der Zelllinien.....                                 | 112 |
| 5.5.5  | Auftauen von Zellen.....  | 113 |
| 5.5.6  | Gewinnung von Zelllysaten.....                                    | 113 |
| 5.5.7  | Test auf Mycoplasmenkontaminationen.....                          | 113 |
| 5.5.8  | Infektionsversuche.....   | 114 |
| 5.5.9  | Fixierung für die Doppelimmunfluoreszenz.....                     | 114 |
| 5.5.10 | Fixierung für die REM.....  | 115 |
| 5.5.11 | Präinkubation der Zellen.....                                     | 115 |
| 5.5.12 | Präinkubation der Bakterien.....                                  | 115 |
| 5.5.13 | Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....                                | 115 |
| 5.5.14 | Apoptosenachweis.....   | 116 |
| 5.5.15 | Verwendete Antikörper und Antikörperverdünnungen.....             | 116 |
| 5.5.16 | Kopplung von Protein an Latexbeads.....                           | 116 |
| 5.5.17 | Vorbereitung der Latexbeads für die FACS-Analyse.....             | 117 |
| 5.5.18 | Transfektion mit FuGENE 6.....                                    | 117 |
| 6      | Literatur.....  | 118 |
| 7      | Anhang.....   | 128 |
| I.     | Spotmembran Sequenzen.....  | 128 |
| II.    | Laborgeräte.....  | 130 |
| III.   | Verbrauchsmaterial.....   | 131 |
| IV.    | Chemikalien.....  | 132 |
| V.     | Aminosäuren.....  | 134 |
| VI.    | Abkürzungen.....  | 134 |
|        | Lebenslauf  |     |
|        | Danksagung  |     |
|        | Eidesstattliche Erklärung   |     |

## Zusammenfassung

*Streptococcus pneumoniae* ist ein humanpathogener Erreger, der Infektionen wie Otitis Media, Pneumonie oder Meningitis auslösen kann. Pneumokokken können symptomlos den respiratorischen Trakt des Menschen besiedeln. Vom Nasopharynx aus können sie aber auch in die Lunge gelangen und den septischen Infektionsprozess auslösen.

*Streptococcus pneumoniae* bindet spezifisch die sekretorische Komponente (SC). Das bakterielle Oberflächenprotein SpsA wurde als Adhäsion der Pneumokokken für die sekretorische Komponente, die den extrazellulären Teil des humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) repräsentiert, beschrieben. Der pIgR wird an der basolateralen Oberfläche mukosaler Epithelzellen exprimiert und transportiert dimeres Immunglobulin A (dIgA) auf die apikale Oberfläche, wo sekretorisches IgA (SIgA) oder freie SC proteolytisch abgespalten werden. Die Interaktion von SpsA mit dem Rezeptor vermittelt die Adhärenz von Pneumokokken an pIgR-produzierende Zellen. Die Bindung der SC an das SpsA der Pneumokokken erfolgt über ein hexameres Bindungsmotiv im N-terminalen Bereich des bakteriellen Proteins.

Die Funktion des SpsA als Adhäsion, das die Anheftung der Pneumokokken an mukosale Epithelzellen vermittelt, wurde in verschiedenen Serotypen nachgewiesen. Die Interaktion des SpsA mit dem pIgR konnte durch Präinkubation mit SpsA-Proteinen, anti-SpsA-Antiserum, SC sowie anti-SC-Antiserum blockiert werden. Die Bindung des bakteriellen Oberflächenproteins SpsA an den Rezeptor ist humanspezifisch. Fluoreszenz- und Elektronen-mikroskopische Studien bewiesen die SpsA-pIgR vermittelte Transmigration der Pneumokokken durch polarisierte mukosale Epithelzellen.

Die Konstruktion chimärer Maus-Human-SC-Moleküle identifizierten die Ectodomänen D3 und D4 als Bindungsmotiv für SpsA. Durch Spotmembrananalysen wurden die Bindungsmotive in D3 und D4 eingegrenzt. *In vitro* Inhibitionsversuche mit chimären SC-Molekülen bestätigten die Funktion der Domänen D3 und D4 bei der Anheftung der Pneumokokken an Epithelzellen. Durch Deletionsmutagenese konnten das Bindungsmotiv auf die Aminosäuren 206-229 in Domäne 3 und 349-389 in Domäne 4 eingegrenzt werden. *In vitro* Inhibitionsversuch mit synthetischen Peptiden sowie der Austausch humaner Aminosäuren gegen die der Maus konnten das Peptid 382-386 in Domäne 4 als essentielles Bindungsmotiv für das bakterielle SpsA identifizieren.



## 2 Einleitung

Akute Infektionen des Respirationstrakts gehören, laut WHO Report aus dem Jahr 2002, nach wie vor zu den am häufigsten auftretenden Infektionskrankheiten und gelten als Hauptverursacher für die durch Infektionen ausgelösten Todesfälle. Etwa 24 % aller durch Infektionskrankheiten verursachten Todesfälle bei Kindern im Alter von bis zu fünf Jahren werden durch Atemwegserkrankungen hervorgerufen. Eine aktuelle Studie ergab, dass im Jahr 2000 weltweit 1,9 Millionen Kinder an Atemwegserkrankungen starben, wobei 70 % der Todesfälle in Afrika und Süd-Asien verzeichnet wurden (WHO Report 2002). Hauptverantwortlich für diese Atemwegserkrankungen bei Kindern sind *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Respiratory syncytial virus* und der *Para Influenza Virus* Typ 3. *Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger bakterieller Pneumonien und verursachen in den USA den größten Teil der Todesfälle die nach Infektionskrankheiten auftreten. So sterben in den Vereinigten Staaten mehr Menschen an einer Pneumokokken-Pneumonie als an AIDS, was aber in den Medien wenig Beachtung findet und somit von der Bevölkerung kaum wahrgenommen wird. Obwohl durch Pneumokokken ausgelöste Infektionen in allen Altersgruppen auftreten können, sind hauptsächlich Kleinkinder und ältere Menschen betroffen. *Streptococcus pneumoniae* ist weiterhin der Auslöser der bakteriellen Meningitis, Otitis Media und Sepsis. Dieses weite Spektrum an Krankheiten, einzigartig unter Gram-positiven Bakterien, zeigt sich auch bei den beiden Gram-negativen Erregern *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis*. Diese drei Erreger können sowohl symptomlos im Nasopharynx überleben, als auch von dort aus Infektionen in der Lunge, dem Gehirn und im Blut auslösen. Für *Haemophilus influenzae* Typ b konnte mittlerweile ein wirksamer Impfstoff gefunden werden, der die Ausbreitung invasiver Erreger deutlich eindämmt. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten zu *Haemophilus influenzae*, wie der Polysaccharid-Kapsel, oder einigen physiologischen Eigenschaften, wie der natürlichen Transformation von DNA und der Autolyse, gibt es nach wie vor Probleme bei der Bekämpfung der Pneumokokken (McCullers and Tuomanen, 2001). Man ist daher sehr daran interessiert, die am Infektionsmechanismus beteiligten Komponenten zu finden, um in den Infektionsprozess der Pneumokokken eingreifen zu können.

## 2.1 Die Gattung *Streptococcus*

Bei der Gattung *Streptococcus* handelt es sich um Gram-positive, in Ketten oder Paaren angeordnete Kokken, die bei einigen Arten eine eher ovale Form statt der häufiger auftretenden Kugelform aufweisen. Streptokokken sind unbeweglich und fakultativ anaerob und sind nicht in der Lage, Sporen zu bilden (Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, 1986; Schlegel, 1992).

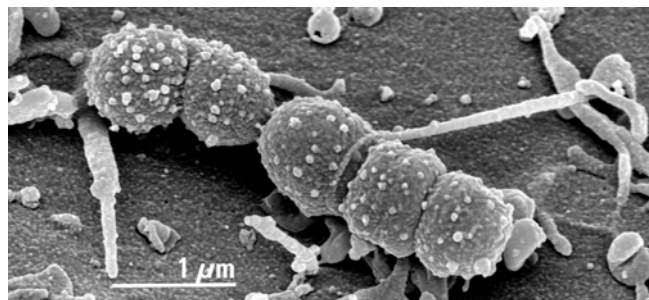
Billroth fand die morphologisch auffälligen Keime 1874 erstmals in Präparaten von Wundeiterungen und gab ihnen aufgrund ihrer Morphologie den Namen Streptokokken. 1903 stellte Schottmüller eine Einteilung der Gattung *Streptococcus* nach ihrem Hämolyseverhalten auf, bei der hämolysierende, vergrünende und nicht-hämolysierende Arten unterschieden werden. Brown führte 1919 den Begriff der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Hämolysen ein. Bei der  $\alpha$ -Hämolysen kommt es zu einer Vergrünung des Blutagars, die durch die Freisetzung von  $H_2O_2$  hervorgerufen wird. Hämoglobin wird zu Methämoglobin reduziert, wobei die Erythrozytenmembranen weitgehend erhalten bleiben. Bei der  $\beta$ -Hämolysen findet eine vollständige Hämolysen statt, bei der die Erythrozyten aufgelöst und das Hämoglobin abgebaut wird. Von der  $\gamma$ -Hämolysen spricht man bei nicht-hämolysierenden Bakterien, die makroskopisch keine Hämolysen zonen aufweisen.

Neben der Unterteilung nach ihrem Hämolysevermögen können Streptokokken anhand ihrer Zellwandpolysaccharide unterschieden werden, die als Antigene wirksam sind. Rebecca C. Lancefield führte schließlich eine Unterscheidung der Streptokokken in serologische Gruppen ein, nach denen die Bakterien in die Lancefield-Gruppen A bis V eingeteilt werden (Kayser *et al.*, 1998; Lancefield, 1933).

## 2.2 Die Art *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae*, auch Pneumokokken genannt, gehören zu den  $\alpha$ -hämolytischen Bakterien, die auf Blutagar in aerober Atmosphäre wachsen und dabei einen deutlichen Vergrünungshof ausbilden (Kayser *et al.*, 1998). Sie sind ovale bis lanzettförmige Diplokokken, bei denen die Einzelkokken an der Basis aneinander liegen.

Kurze Ketten oder Einzelkokken können ebenfalls, in Abhängigkeit von Kulturmateriail und Kulturmedium, auftreten. Die gram-positiven Bakterien wachsen als mehr oder weniger schleimige (smooth oder rough Form), glänzende Kolonien heran, was auf ihre Polysaccharidkapsel zurückzuführen ist. Bekapselte Stämme sind pathogen für Menschen und Versuchstiere, während Stämme ohne Kapselpolysaccharide nicht pathogen sind (Watson und Musher, 1990). Besonders im direkten Grampräparat kann die Polysaccharidkapsel der Pneumokokken als helle Zone um die blau-violett angefärbten Kokken sichtbar gemacht werden. Aneinander liegende Einzelkokken werden dabei von einer gemeinsamen Kapsel umschlossen (Brandis, 1994). Die Kapsel der Pneumokokken lässt sich weiterhin in der so genannten Neufeldschen Quellungsreaktion durch Suspension der Bakterien in ihrem homologen Antiserum darstellen (Neufeld, 1902; Reinert, 1995). Im submikroskopischen Bereich ist vor allem die chemische und antigene Struktur der Kapsel von Interesse, da sie aufgrund ihrer antiphagozytären Wirkung den wichtigsten Virulenzfaktor der Pneumokokken darstellt. Pneumokokken benötigen ein komplexes Nährmedium zur Vermehrung, das Blut oder zumindest Serum enthalten muss. Blutagar ist das feste Medium der Wahl, auf dem die Pneumokokken in aerober Atmosphäre wachsen.



**Abbildung 1:** *Streptococcus pneumoniae* auf einer humanen Epithelzelle (Bild: Manfred Rohde, GBF)

*Streptococcus pneumoniae* wurde erstmals 1881 von Pasteur und Sternberg unabhängig voneinander isoliert (Sternberg, 1881). Der Zusammenhang zwischen dem Bakterium und der Lobärpneumonie wurde 1883 von Friedlander und Talamon beschrieben. Die Pneumokokken-Pneumonie wurde häufig mit anderen Typen der

Lungenentzündung verwechselt, bis 1884 die Gramfärbung einen sicheren Hinweis auf *Streptococcus pneumoniae* geben konnte.

1928 beschrieb Griffith zum ersten Mal die Möglichkeit der Transformation bei Pneumokokken (Griffith, 1928). Er erkannte, dass abgetötete bekapselte Pneumokokken die Fähigkeit zur Kapselbildung wiedererlangten, wenn sie zusammen mit unbekapselten Stämmen in Mäuse injiziert wurden und den Tod der Versuchstiere auslösten. Sie besitzen also die Fähigkeit, exogene DNA aufzunehmen und durch homologe Rekombination in ihr Genom zu integrieren. Die Aufnahmefähigkeit der Pneumokokken hängt dabei allerdings von der Wachstumsphase der Bakterien in Kultur und dem verwendeten Kulturmedium ab (Tomasz, 1965). So kann zum Beispiel durch Wachstum in sogenanntem CpH8-Medium eine natürliche Kompetenz der Bakterien induziert werden, die in Komplexmedium nicht erreicht wird. Zur Unterstützung der Kompetenz kann das sogenannte „Competence Stimulating Peptide“ (CSP) zu einer wachsenden Kultur gegeben werden, in der das Peptid als Pheromon die Aufnahme der DNA begünstigt (Håverstein *et al.*, 1995).

1925 zeigte Avery zusammen mit seinen Kollegen, dass Pneumokokken von einer Polysaccharidkapsel umgeben sind (Avery und Heidelberger, 1925; Avery und Morgan, 1925). In den folgenden 20 Jahren wurden ihre strukturelle und chemische Struktur, sowie ihr Einfluss auf die Virulenz beschrieben. Bis 1940 waren mehr als 80 Serotypen von Pneumokokken erkannt. Schon seit 1911 war man daran interessiert, einen effektiven Impfstoff gegen *Streptococcus pneumoniae* zu entwickeln. Nachdem man allerdings in den 40er Jahren mit Penicillin gute Heilungserfolge erzielte, ließ das Interesse an einem Impfstoff aber stark nach. Da trotz der Antibiotikabehandlung immer noch viele Patienten starben, wurde die Suche nach einem polyvalenten Impfstoff wieder aufgenommen und 1977 der erste Pneumokokkenimpfstoff in den USA lizenziert. Im Jahr 2000 kam ein neuer Konjugatimpfstoff auf den Markt. Weiterhin wurde 2001 schließlich die Genomsequenz der Pneumokokken, bestehend aus 2.160.837 Basenpaaren, aufgeklärt (Tettelin *et al.*, 2001).

Pneumokokken treten transient fakultativ im humanen Nasopharynx auf. Ungefähr 40-70% der gesunden Erwachsenen sind Keimträger, ohne dass es bei ihnen zu Krankheitserscheinungen kommt (Kayser, 1998). Die Rate der asymptomatischen Träger variiert mit ihrem Alter und mit der Region, in der sie leben. So sind zum Beispiel nur etwa 5-10 % der kinderlosen Erwachsenen Keimträger. In Schulen und

Altenheimen hingegen liegt diese Zahl bei 27-58 % der Schüler und älteren Menschen, die Träger von Pneumokokken sind. *Streptococcus pneumoniae* ist also meist nur ein Kommensale und verursacht, gemessen an der hohen Expositions- und Kolonisationsrate, in relativ wenigen Fällen eine invasive Erkrankung. Das Auftreten der asymptomatischen Erreger kann sich im Laufe des Lebens mehrmals wiederholen, wobei verschiedene Serotypen auftreten können. Diesem Wechsel der Pneumokokken Serotypen wird eine wichtige Bedeutung beim Erwerb der natürlichen Immunität zugesprochen (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Berry and Paton, 2000; Paton *et al.*, 1997).

## 2.3 Krankheitsbild

Pneumokokkeninfektionen gehen in der Regel von ihrem natürlichen Habitat, der Schleimhaut des oberen Respirationstrakts aus. Die Infektionsgefahr ist für Kleinkinder unter 2 Jahren sowie für ältere Menschen ab dem 50. Lebensjahr am größten (Gray, 1979; von Kries *et al.*, 2000). Das Risiko für das Auftreten einer Pneumokokken Pneumonie ist bei Personen, wie Zigarettenrauchern, Patienten mit chronischer Bronchitis, Asthma und/oder anderen chronischen Lungenerkrankungen sowie bei Patienten mit einem Krebsleiden in der Lunge stark erhöht. Die Bindung von Pneumokokken an Epithelzellen der Luftröhre kann durch vorangegangene Influenza-Virusinfektionen, oder eine andere lokale oder allgemeine Schwäche, wie Defekte im Komplementsystem, Diabetes mellitus, Asthma oder eine HIV-Infektion verstärkt werden (Plotkowski, 1986; Kayser *et al.*, 1997). Weiterhin sind Alkoholiker, Bewohner von Alten- oder Pflegeheimen sowie chronisch Leberkranke oder Nierenkranke sowie Krebs Patienten stärker gefährdet als gesunde Menschen (Musher, 1992).

Typische lokale Pneumokokkeninfektionen des oberen Respirationstraktes sind Otitis media, die häufigste Infektionserkrankung im Kindesalter (Musher, 1992), und akute Sinusitis (Brandis, 1994). In seltenen Fällen können Pneumokokken als Verursacher einer Endokarditis und Perikarditis festgestellt werden (Musher, 1992). Bei den Infektionen im unteren Respirationstrakt ist *Streptococcus pneumoniae* der häufigste Erreger einer außerhalb des Krankenhauses erworbenen Pneumonie (Boulnois, 1992), und der zweithäufigste Erreger, nach *Neisseria meningitidis*, der bakteriellen

Meningitis (Dagan, 1994; Burman *et al.*, 1985). Bei bis zu 25 % der Pneumokokken-Pneumonien kommt es zum Übertritt der Bakterien in die Blutbahn, was zur Entwicklung einer Bakteriämie führen und schließlich eine Pneumokokken-Sepsis auslösen kann (Lee *et al.*, 1991). Diese Streuung in den Blutkreislauf ist der wichtigste Infektionsweg für eine Pneumokokken-Meningitis, die nach dem Durchbrechen der Blut-Hirn-Schranke hervorgerufen werden kann (Tuomanen *et al.*, 1995). Alternativ können die Meningen auch direkt aus dem Mittelohr oder den Nasennebenhöhlen infiziert werden (Boulnois, 1992). Erreichen die Pneumokokken die Meningen und den Subarachnoidalraum, entsteht die für Pneumokokken typische eitrige „Haubenmeningitis“. Trotz der Verfügbarkeit von Antibiotika ist die Sterblichkeit durch Krankheiten, die von Pneumokokken ausgelöst werden, immer noch sehr hoch. So lag zum Beispiel die Sterblichkeit für die Pneumokokken-Bakteriämie zwischen 1950 und 1989 stabil zwischen 25 und 29 % (Gillespie, 1989).

Infektionen des Respirationstrakts sind verantwortlich für 1,9 Millionen Todesfälle bei Kindern bis zu 5 Jahren. Pneumokokken verursachen davon etwa 1 Million Todesfälle, von denen die meisten in Entwicklungsländern gezählt werden.

In Europa und den USA ist die Pneumokokken-Pneumonie die am häufigsten auftretende bakterielle Pneumonie, mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 100 Fällen pro 100.000 Personen. Etwa 50 % dieser Pneumonien werden erst im Krankenhaus erworben. Die Pneumokokken-Pneumonie ist eine bekannte bakterielle Komplikation einer vorausgehenden Virusinfektion wie der Influenza oder Masern-Erkrankung. Als Komplikationen der Pneumokokken-Pneumonie können Infektionen des Rippenfells, Herzbeutelentzündung und endobronchiale Infektionen verbunden mit der Bildung von Lungenabszessen auftreten. Mehr als 50 % aller Pneumokokken-Pneumonien verlaufen letal (Reinert, 1995).

Pneumokokken verursachen weiterhin 13-19 % der insgesamt 3000-6000 Fälle von bakterieller Meningitis, die jährlich in den USA auftreten. Dabei haben bis zu 25 % der Meningitis Patienten zusätzlich eine Lungenentzündung. Die Sterblichkeitsrate der Pneumokokken-Meningitis beträgt etwa 30 %, kann aber bei älteren Menschen bis 80 % betragen (von Kries *et al.*, 2000).

In etwa 25-30 % der Fälle von Pneumokokken-Pneumonie, die in den USA auftreten, kommt es gleichzeitig zum Ausbruch einer Pneumokokken-Bakteriämie. Mehr als

50.000 Menschen sind davon pro Jahr betroffen. Die Sterblichkeitsrate beträgt hier ungefähr 20 %, kann aber bei alten Menschen bis auf 60 % ansteigen.

Pneumokokken sind ein weit verbreiteter Auslöser akuter Otitis Media und werden in etwa 28 – 55 % aller Mittelohr-Infektionen nachgewiesen. Für Otitis Media werden jährlich 7 Millionen Fälle in den USA verzeichnet. Im Alter von gerade einmal 24 Monaten hatten bereits etwa 62 % aller Kinder mindestens eine akute Mittelohrentzündung.

Das deutsche Statistische Bundesamt schätzt die Zahl der jährlichen Pneumoniefälle auf 350 000 bis 500 000, was einer Inzidenz von 429 bis 613 Fällen pro 100 000 Personen entspricht. 30 bis 50 % dieser Infektionen sind durch *S. pneumoniae* bedingt. Schätzungen ergeben für Kinder und Jugendliche unter 16 Jahren eine Inzidenz der Pneumokokken-Meningitis von 1,63 pro 100 000. Die durchschnittliche Inzidenz dieser Erkrankung bei Kindern unter 1 Jahr liegt mit 10,74 pro 100 000 wesentlich höher.

## 2.4 Antibiotika-Resistenzen

Bei Pneumokokkeninfektionen ist immer noch Penicillin G das Chemotherapeutikum der ersten Wahl (Musher, 1992). In den letzten Jahren wurden allerdings in vielen Teilen der Welt, wie z.B. Südafrika, Spanien, Ungarn, inzwischen auch in Deutschland, zunehmend Pneumokokkenstämme mit mäßiger Empfindlichkeit oder sogar Resistenz gegen Penicillin G gefunden (Pallars, 1987; Brandis, 1994). Der erste Stamm mit verminderter Penicillin-Empfindlichkeit wurde in Australien isoliert (Hansman und Bullen, 1967). In den 70er Jahren verbreiteten sich solche Stämme vor allem in Australien und Neu-Guinea (Appelbaum *et al.*, 1977) und werden seit Anfang der 80er Jahre weltweit isoliert (Appelbaum, 1992). Für die weltweite Ausbreitung der Resistenz wurden einige wenige hochresistente Klone der Serotypen 6B, 19F, und 23F verantwortlich gemacht (Davies *et al.*, 1999; McDougal *et al.*, 1992).

In einigen Gegenden der USA sind heute bis zu 35 % der invasiven Pneumokokken-Isolate resistent gegen Penicillin G. In einigen Regionen Lateinamerikas zeigen bis zu 60 % der Pneumokokken diese Resistenz. In einigen Ländern Asiens liegt diese Zahl sogar bei 80 % (Jones, 1999; Song *et al.*, 1999). In Europa werden zurzeit besonders hohe Resistenzraten für Penicillin in Spanien, Frankreich, Bulgarien,

Griechenland und der Türkei festgestellt. Fluorochinolonresistente Pneumokokken werden allerdings noch sehr selten isoliert (Reinert, 1997).

Patienten, die allergisch auf Penicillin reagieren, können stattdessen mit Erythromycin gegen eine Pneumokokken-Pneumonie oder mit Chloramphenicol gegen eine Pneumokokken-Meningitis behandelt werden. Penicillinresistente Pneumokokken zeigen häufig auch eine Resistenz gegen Trimethoprim-sulfamethoxazole (20-35,9 %) und gegen Tetracycline (8-16,6 %) (Hofmann *et al.*, 1995; Doern *et al.*, 2001). Dagegen reagieren die meisten *Streptococcus pneumoniae* Stämme immer noch hoch empfindlich auf Rifampicin. Resistenzen von Pneumokokken gegen Makrolide und Azalide, wie Clarithromycin, Erythromycin und Azithromycin, steigen seit den späten 80er Jahren stetig an. So waren 1988 gerade einmal 0,2 % der Pneumokokken resistent gegen Makrolide (Jorgensen J.H., *et al.* 1990). Dies steigerte sich jedoch mit den Jahren auf 6,4 % in 1992, 10,6 % in 1995, 13,9 % in 1996 bis hin zu 20,4 % in 1999 (Felmingham D. and Washington J., 1999).

## 2.5 Impfstoffe

Pneumokokkeninfektionen kommen endemisch vor und können zu allen Jahreszeiten auftreten. Durch aktive Immunisierung kann ein gewisser Schutz vor einer solchen Infektion gewährt werden. Antikörper gegen Kapselpolysaccharide verleihen ein hohes Maß an Immunität gegen Pneumokokken des homologen Kapseltyps. Es gibt allerdings große Virulenzunterschiede zwischen den einzelnen Typen. Bei gefährdeten Personen kann eine aktive Schutzimpfung mit einem Vakzin, das aus gereinigten Polysacchariden der 23 häufigsten Serovare besteht, durchgeführt werden. Das Pneumokokken-Vakzin Pneumovax 23<sup>®</sup> enthält die Kapselpolysaccharide der am häufigsten bei systemischen Infektionen vorkommenden Serotypen (Broome *et al.*, 1980). 86 % aller isolierten Pneumokokken in Europa und den USA weisen die in dem Impfstoff vorhandenen Kapselantigene auf (Reinert, 1995). Weiterhin löst dieser Impfstoff eine Kreuzreaktivität mit einigen anderen Kapseltypen aus, die für weitere 8 % der Pneumokokken-Erkrankungen verantwortlich sind.

Polysaccharidimpfstoffe sind aus aufgereinigten Kapselpolysacchariden der Pneumokokken zusammengesetzt. Antikörper gegen Kapselpolysaccharide schützen



vor invasiven Pneumokokken-Infektionen, indem sie das Komplementsystem aktivieren (Eskola, 1995). 1977 wurde in den USA die Lizenz für einen 14-valenten Impfstoff, zusammengesetzt aus Kapselpolysacchariden 14 verschiedener Pneumokokken-Typen, erteilt. 1983 löste der 23-valente Polysaccharidimpfstoff (PPV23) den 14-valenten Impfstoff ab, der seither nicht mehr produziert wurde. Leider sind Polysaccharidimpfstoffe nicht für die Immunisierung von Kindern unter 2 Jahren geeignet, da kein langfristiger Schutzeffekt erzielt werden kann (Fedson, 1999; Van Dam *et al.*, 1990). Die Immunogenität verschiedener Pneumokokken-Serotypen unterscheidet sich bei Säuglingen und Kleinkindern. So können Antikörper gegen Kapsel-Antigene der Typen 6, 14, 19 und 23 erst ab etwa dem sechsten Lebensjahr gebildet werden. Andere Typen können bei Kontakt bereits im Alter von sechs Monaten die Antikörperbildung auslösen. Ein weiterer Nachteil der Kapselpolysaccharidimpfstoffe ist das Ausbleiben eines immunologischen Gedächtnisses bei kleinen Kindern.

Der Protein-Konjugatimpfstoff Prevnar® (PNCRM7, von Wyeth-Lederle-Vaccines hergestellt) wurde im Jahr 2000 in den Vereinigten Staaten zugelassen. Er setzt sich aus aufgereinigten Kapselpolysacchariden von sieben *Streptococcus pneumoniae* Serotypen (4, 6B, 9V, 14, 19F und 23F sowie einem Oligosaccharid des Serotyps 18C) zusammen, die mit einer nichttoxischen Variante des Diphtherietoxins CRM<sub>197</sub> als Trägerprotein konjugiert sind. Während Polysaccharid-Impfstoffe T-Zell-unabhängige Antigene sind und deshalb in den ersten 18 bis 24 Lebensmonaten keine schützende Immunantwort hervorrufen, führt die Konjugation des Kapselantigens an ein Trägerprotein zu einem T-Zell-abhängigen Antigenkomplex. Dieser induziert eine lang andauernde Immunantwort. Dadurch wird aus einem T-Zell-unabhängigen Antigen ein T-Zell-abhängiges und somit ein für Kinder geeigneter Impfstoff. Die Serotypen, die in Prevnar® vereinigt wurden, sind verantwortlich für 86 % der Bakteriämien, 83 % der Meningitiserkrankungen und 65 % der akuten Otitis Media Fälle bei Kindern unter 6 Jahren, die in den Jahren 1978-1994 in den USA auftraten. Weitere Pneumokokken Polysaccharid Konjugatimpfstoffe, die 9 oder 11 Serotypen abdecken, sind in der Entwicklung.

Konjugatimpfstoffe liefern auch nur einen Schutz gegen die beinhalteten Serotypen. Da sie aber einen höheren Antikörpertiter erreichen, führt das Konjugat zu einer effizienteren Immunantwort in Kleinkindern und immungeschwächten Personen. Weiterhin kann durch den Impfstoff ein „Immunologisches Gedächtnis“ induziert

werden, indem der Körper dem Antigen mehrmals ausgesetzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass der Protein-Konjugatimpfstoff nicht nur vor invasiven Infektionen schützt, sondern dass er auch die Besiedlung des Nasopharynx durch Pneumokokken unterdrückt.

## 2.6 Pathogenese

Pneumokokken-Infektionen werden durch Tröpfcheninfektionen weitergegeben (Andersson, 1988). Die Mechanismen, durch die sich aus einem harmlosen Kommensalen des Nasopharynx ein Krankheitserreger entwickelt, der vom Nasopharynx in die Lunge wandert und Pneumonien verursacht oder ins Blut gelangt und Sepsis auslöst, sind erst wenig verstanden (Boulnois, 1992). Das Versagen der spezifischen Abwehr mit sekretorischem IgA oder der nicht-spezifischen Abwehr wie dem Hustenreflex, der Schleimsekretion oder dem ciliären Transport im Respirationstrakt, ermöglicht den Pneumokokken den Zugang zu den Bronchien und zur Lunge (Boulnois, 1992; Musher, 1992). Dabei hat zum Beispiel das Pneumolysin der Pneumokokken einen Einfluss auf den Cilienschlag der Epithelzellen sowie auf den spezifischen Abwehrmechanismus. Weiterhin können Pneumokokken durch die Zerstörung epithelialer Monolayer durch Hydrogenperoxid und Pneumolysin in die Blutbahn gelangen. Des Weiteren ist noch sehr wenig über die Adhärenz der Pneumokokken an eukaryotische Zellen und ihre Invasion in das Zellinnere bekannt. *Streptococcus pneumoniae* ist in der Lage an mukosalen Oberflächen zu binden, woran unterschiedliche Rezeptoren beteiligt sind (Cundell *et al.*, 1994; Cundell and Tuomanen, 1994). Die Adhärenz an cilienbesetzte tracheobronchiale Epithelzellen ist jedoch nicht möglich. In den Alveolen stehen den Erregern im Vergleich zum Nasopharynx wieder andere Oberflächenrezeptoren zur Verfügung. Gelingt es den Pneumokokken aus dem Nasopharynx heraus die cilienbesetzten Zellen zu umgehen und in die Lunge zu gelangen, sorgt ihre Polysaccharidkapsel dafür, dass sie der Phagozytose und Zerstörung durch die alveolären Macrophagen entkommen und sie sich ausbreiten können.

Für *Streptococcus pneumoniae* konnte eine morphologische Varianz nachgewiesen werden, die für die Fähigkeit der Bindung an Zellen des Nasopharynx verantwortlich ist (Weiser *et al.*, 1994). Pneumokokken werden dabei nach ihrem Aussehen in

transparente und opaque Varianten unterschieden. Ursache für die unterschiedliche Erscheinung ist die Stärke der Expression von Oberflächen-Proteinen, die an der Adhärenz beteiligt sein könnten. Opaque Varianten besitzen eine Kapsel und zeigen eine stärkere Virulenz als transparente Varianten (Weiser *et al.*, 1994). Die Phasenvariation scheint eine Anpassung der Pneumokokken darzustellen, die es dem Erreger ermöglicht, im Wirt zu überleben (Kim und Weiser, 1998). Patientenisolat aus dem Nasenrachenraum oder aus der Lunge zeigen meist den transparenten Kolonietyp, der bei weiterer Kultivierung aber auch wieder in den opaken Kolonietyp umgewandelt werden kann.

Gram-positive Bakterien haben eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen an die Zellen der extrazellulären Matrix zu binden, zu kolonisieren und in die Zellen einzudringen (Westerlund und Korhonen, 1993). Die Anheftung der Pneumokokken an orale Epithelzellen erfolgt über ein Disaccharid, das über eine  $\beta$ 1-3 Bindung an einen Galaktoserest mit der Zelloberfläche verbunden ist. Stämme des transparenten Kolonietyps binden stärker an diese Zellen, als es die opaken Kolonietypen vermögen. Durch Inhibition mit einem strukturanalogen Disaccharid konnte die Adhärenz der Bakterien reduziert werden (Cundell und Tuomanen, 1995). In der Lunge binden Pneumokokken an Typ II Pneumocyten, die das Disaccharid N-Acetyl-Galaktosamin an ihrer Oberfläche tragen, das hier entweder über eine  $\beta$ 1-3- oder eine  $\beta$ 1-4-Bindung mit einem Galaktoserest verbunden ist (Anderson *et al.*, 1983; Krivan *et al.*, 1988). Die Adhärenz an vasculäre Endothelzellen erfolgt ebenfalls durch die Bindung an die beiden Disaccharide GalNAc $\beta$ 1-3Gal oder GalNAc $\beta$ 1-4Gal.

Adhärenz, Invasion sowie der Tod von Pneumokokken im unteren Respirationstrakt tragen durch Aktivierung von Cytokinen und dem Komplementsystem zu Entzündungsreaktionen bei. Die Aktivierung von Pneumozyten und Endothelzellen wird durch die proinflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 (IL-1) verursacht. Sie führt zu einer verstärkten Expression des Platelet-activating factors (PAF). Über das Phosphorylcholin der Bakterienzellwand können Pneumokokken an den Rezeptor binden und in die Zelle eindringen (Ring *et al.*, 1998; Cundell *et al.*, 1995). Etwa 70 % der Bakterien werden so in die Zellen transportiert (McCullers and Tuomanen, 2001). Phosphorylcholin bildet einen Anker für die cholinbindenden

Proteine (Cbp). Transparente Kapseltypen zeigen auch bei diesem Prozess eine stärkere Adhärenz als opaque Typen.

Das Komplementsystem kann über zwei verschiedene Wege aktiviert werden, den klassischen und den alternativen Weg. Antikörper (IgG, IgM), die mit einem Antigen reagiert haben, stimulieren meist den klassischen Weg. Wird ein Antigen auf dem Bakterium erkannt, führt die Aktivierung zum Aufplatzen der Zelle. Lösliche Antigene bilden mit den Antikörpern einen Immunkomplex, der von phagozytierenden Zellen beseitigt wird. Der alternative Weg wird durch die Zellwand bestimmter Mikroorganismen aktiviert, ohne dass dabei Antikörper beteiligt sind. Das Komplement, ein System aus mindestens 18 verschiedenen Komplementfaktoren, trägt zu einer verstärkten Opsonisierung der Bakterien bei. Die Faktoren werden erst durch die Aktivierung enzymatisch aktiv (van den Tweel, 1999).

Peptidoglykan-Fragmente aktivieren den alternativen Komplementweg und lösen die IL-1 Produktion in Makrophagen aus. Teichonsäuren in der Bakterienzellwand aktivieren ebenfalls den alternativen Weg und lösen die Produktion von Cytokinen aus (Winkelstein und Tomasz, 1978).

Im Fall einer Pneumokokken-Pneumonie produziert der Körper Antikörper gegen Antigene in der bakteriellen Zellwand. Die Antikörper gelangen durch Poren der Kapsel an die Oberfläche der Bakterien, binden an die Bakterien und aktivieren das Komplement über den klassischen Weg. Daran beteiligt sind die Komplementfaktoren C5a und C3b, die allerdings nicht zur Phagozytose der Bakterien führen. An die Zellwand gebundenes C3b ist aufgrund der physikalischen Barriere durch die Kapsel nicht in der Lage, mit Phagozytose-Rezeptoren in Kontakt zu treten. C3b wird schließlich durch Protein H, das an die Kapsel gebunden ist, erkannt und degradiert (Angel *et al.*, 1994).

## 2.7 Virulenzfaktoren

*Streptococcus pneumoniae* ist mit einer Reihe von Virulenzfaktoren ausgestattet, die die Kolonisation und Invasion des Wirtes durch die Bakterien ermöglichen (Salysers und Whitt, 1994). Kapselpolysaccharide werden als Hauptvirulenzfaktoren angesehen (AlonsoDe Velasco *et al.*, 1995). Gelangen Pneumokokken in den

Blutstrom, werden sie durch ihre Polysaccharidkapsel vor der Komplement-vermittelten Phagozytose durch polymorphkernige Lymphozyten geschützt (Fine, 1975; Chudwin *et al.*, 1985; Bruyn *et al.*, 1992). Kapselpolysaccharide sind nur schwach immunogen, weshalb Pneumokokken gut vor der spezifischen humoralen Immunabwehr geschützt sind (Gillespie und Balakrishnan, 2000; Fine, 1975; Chudwin *et al.*, 1985). Das wird außerdem durch die starke strukturelle Variabilität der Bakterien, die den 90 verschiedenen Serotypen zu verdanken ist, unterstützt. Die 10 am häufigsten auftretenden Serotypen werden mit etwa 62 % aller invasiven Erkrankungen weltweit in Verbindung gebracht (Gray, 1979). Dabei unterscheiden sich die Serotypen in Abhängigkeit der Altersgruppen und der geographischen Region, in der die Erkrankungen auftreten. Die Serotypen 1 und 2 wurden als die invasivsten Serotypen beschrieben (Tomasz, 1995). Nur bekapselte Stämme sind für Mensch und Versuchstier virulent. Unbekapselte, raue Varianten (R-Varianten), sind avirulent (Briles *et al.*, 1992). Mutanten mit geringerer Kapselbildung als der zugehörige Wildtypstamm weisen daher im Tierexperiment auch eine verminderte Virulenz auf. Allerdings bestehen große Virulenzunterschiede zwischen den einzelnen Typen. So ist der Serotyp 3 schon seit langem als besonders virulent bekannt, Serotyp 37 dagegen ist avirulent.

Kapselpolysaccharide sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verbunden und enthalten Mono-, Di- und Trisaccharide, sowie Aminosucker, Choline, Acetyl- und Phosphorylgruppen (Van Dam, 1990). Kapselpolysaccharide werden während der Vermehrung der Pneumokokken in die Umgebung abgegeben. Dies spielt insofern für die Pathogenese eine Rolle, als dadurch Antikörper neutralisiert werden und die für die Phagozytose erforderliche Opsonisierung der Erreger verhindert wird. An der Bakterienoberfläche sind weiterhin Zelloberflächenproteine lokalisiert, die am Infektionsprozess beteiligt sind. Sie können direkt mit der Wirtsoberfläche interagieren oder auch eine Schutzfunktion für die eigene Bakterienoberfläche ausüben.

Unter der Polysaccharidkapsel liegt die Zellwand der Pneumokokken, eine dynamische Struktur, bestehend aus einem Glycangerüst mit mehr als einem Dutzend strukturell unterschiedlicher Peptide (Tomasz und Fischer, 2000). Wie bei anderen Gram-positiven Bakterien besteht sie aus dem Peptidoglykan Murein, einem Heteropolymer, in dem N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) in alternierender Folge  $\beta$ -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Die

heteropolymeren Ketten sind untereinander peptidisch quervernetzt (Schlegel, 1992). Teichonsäuren, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Choline, Choline-bindende Proteine (Rosenow *et al.*, 1997), LicD (Zhang *et al.*, 1999) und das Pneumokokkenoberflächenprotein A (PspA) (Yother und White, 1994) sind Zellwandbestandteile von Pneumokokken. Viele dieser Bestandteile sind wichtige Determinanten der Adhäsion an eukaryotische Zellen (Geelen *et al.*, 1993) und oft auch Virulenzfaktoren. So führt beispielsweise die genetische Inaktivierung des PspA-Gens zur verringerten Virulenz im Tierversuch (Briles *et al.*, 1988). Die Inaktivierung des LicD Gens führt zu verminderter Adhärenz, Kolonisation und Virulenz im Mausversuch (Zhang *et al.*, 1999).

Schätzungen zu Folge gibt es mehr als 500 Oberflächenproteine, von denen einige für die Pathogenität und die Virulenz der Pneumokokken von großer Bedeutung sind. Die meisten dieser Proteine und deren Funktionen sind allerdings noch unklar. Einige andere werden zurzeit noch untersucht. So zum Beispiel die noch wenig bekannten **Neuraminidasen**, NanA und NanB. Pneumokokken produzieren multiple Isoenzyme der Neuraminidase, welche an der bakteriellen Oberfläche lokalisiert sind (Camara *et al.*, 1994). Neuraminidase spaltet die terminale Sialinsäure von Glykolipiden, Glykoproteinen und Oligosacchariden und potenziert damit die Pneumokokken-induzierte Zytotoxizität (Berry *et al.*, 1996). Neuraminidasen tragen weiterhin zur Pathogenität von Pneumokokken in Mäusen bei (Lock *et al.*, 1988). Die Aktivität von NanB ist im Vergleich zu NanA jedoch etwa 100-mal geringer (Berry *et al.*, 1996; Lock *et al.*, 1988). In Immunisierungsstudien mit NanA konnte im Mausmodell ein Schutz gegenüber virulenten Pneumokokken beobachtet werden (Lock *et al.*, 1988). Bei *Streptococcus pneumoniae* wurde weiterhin eine **IgA1-Protease** gefunden, die eine Rolle in der Virulenz der Pneumokokken zu spielen scheint (Wani *et al.*, 1996; Poulsen *et al.*, 1996). IgA-Proteasen sind eine heterogene Gruppe von zellwandassoziierten, extrazellulären Endopeptidasen, welche humanes IgA inaktivieren, indem sie das Immunglobulin in ein Fab und Fc Fragment spalten. Das könnte eine wichtige Kolonisationsstrategie darstellen, die es den Bakterien ermöglicht, die erste unspezifische Immunbarriere der Mukosa zu umgehen (Poulsen *et al.*, 1996).

Die **Hyaluronidase** ist ein von Pneumokokken und anderen Streptokokken produziertes, sezerniertes Enzym, das die Depolymerisierung von Hyaluronsäure in

der extrazellulären Matrix katalysiert und somit die Ausbreitung der Erreger im Gewebeverband fördert. Ihr wird eine wichtige Rolle bei der Invasion zugeschrieben (Humphrey, 1944). Das Substrat, die Hyaluronsäure, ist ein wichtiger Bestandteil von Bindegewebe und extrazellulärer Matrix. Die Rolle der Hyaluronidase beim neuronalen Zelltod ist bislang nicht untersucht. Es wird jedoch vermutet, dass hohe Hyaluronidase-Aktivität eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer Meningitis ist.

*Streptococcus pneumoniae* besitzt, wie nahezu alle Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, mehrere **ABC-Transportproteine** (sogenannte adenosine triphosphate(ATP)-binding cassette). Diese Transporter sind essentiell für die Aufnahme und Abgabe verschiedenster Nährstoffe und Stoffwechselprodukte der Bakterien. Einige der Transporter haben auch eine Bedeutung für die bakterielle Virulenz. So führt die Inaktivierung eines ABC-Eisentransporters (Pit-Gen) zu einer abgeschwächten Virulenz im Maus-Modell der Sepsis und Pneumonie (Brown *et al.*, 2001). Die Inaktivierung des ABC-Mangan Permease Komplexes Psa führt zu einer Verminderung von Autolyse, Adhäsion und Virulenz (Berry and Paton, 1996; Sampson *et al.*, 1994). Das Pneumococcal surface antigen A (PsaA) war zunächst als Adhäsion beschrieben worden, das die Bindung an Pneumocyten vermittelt (Sampson *et al.*, 1994). Es ist für den Transport von Mangan- und Zinkionen im Cytoplasma der Pneumokokken verantwortlich (Dintilhac *et al.*, 1997).

Die  **$\alpha$ -Enolase** (Eno) der Pneumokokken, ein glykolytisches Enzym, wurde sowohl im Cytoplasma als auch an der Zelloberfläche lokalisiert. Sie katalysiert die Reaktion von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat unter Abspaltung von Wasser. Die  $\alpha$ -Enolase wurde als Plasminogen-bindendes Protein identifiziert (Bergmann *et al.*, 2001), welches das Proenzym der Serin-Proteinase Plasmin darstellt. Plasmin spielt eine wichtige Rolle während der Fibrinolyse (Collen und Verstraete, 1975). Durch Reassoziierung von freier Enolase kommt es zu einer gesteigerten Bindung von Plasminogen. Die Bindung der Pneumokokken über die  $\alpha$ -Enolase an humanes Plasminogen und die damit verbundene Aktivierung von Plasmin könnte zur Virulenz der Erreger beitragen, indem sie durch die proteolytische Wirkung des Plasmins in Wirtszellen eindringen könnten.

Weiterhin besitzen Pneumokokken keine Katalase und produzieren deshalb relativ große Mengen an **Wasserstoffperoxid** ( $H_2O_2$ ) (Avery und Morgan, 1924; Pericone *et al.*, 2000), was oxidative Schädigungen an Wirtszellen bewirken kann. Die

Mutation der Pyruvatoxidase, eines der Schlüsselenzyme für die  $H_2O_2$ -Produktion in Pneumokokken, bewirkt eine Reduktion der  $H_2O_2$ -Produktion um das 100-fache und eine deutlich reduzierte Virulenz im Tierversuch (Spellerberg *et al.*, 1996).

Ein weiterer Virulenzfaktor von *Streptococcus pneumoniae* ist **PavA** (pneumococcal adhesion and virulence protein A), ein 63,3 kDa großes Oberflächenprotein, das durch immunoelektronenmikroskopische Aufnahmen auf der Bakterienoberfläche lokalisiert werden konnte. PavA besitzt, genau wie das Eno-Protein, weder ein Motiv für den allgemeinen Sekretionsweg, noch ein für Gram-positive Bakterien übliches C-terminales „LPXTG“-Motiv zur Verankerung in der Zellwand (Navarre und Schneewind, 1994). PavA bindet an die immobilisierte Form des adhäsiven Glykoproteins Fibronektin, eine Komponente der extrazellulären Matrix. Es konnte gezeigt werden, dass PavA die Bindung von Pneumokokken an Fibronektin inhibiert und dass die Bindung von *pavA*-Mutanten an Fibronektin reduziert ist. Weiterhin kann die Bindung durch Heparin blockiert werden, was auf eine Interaktion der Pneumokokken mit dem Fibronektin über die Heparin-Bindungsstelle des Fibronektins hindeutet (Holmes *et al.*, 2001). Im Maus-Modell zeigte eine *pavA*-Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm (D39) eine deutlich reduzierte Virulenz. Dies deutet darauf hin, dass PavA ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist, der einen potenziellen Impfstoffkandidaten darstellt (Holmes *et al.*, 2001). PavA weist eine 67 %ige Homologie zu Fbp54, einem fibronektinbindenden Protein aus *Streptococcus pyogenes* auf (Holmes *et al.*, 2001; Courtney *et al.*, 1996).

**Pneumolysin** ist ein multifunktionales, 53 kDa großes Toxin, das von nahezu allen klinischen Pneumokokken-Isolaten produziert wird (McDaniel *et al.*, 1987; Boulnois, *et al.*, 1991). Es gehört zur Familie der Thiol-aktivierten Toxine und ist in niedrigen Konzentrationen cytotoxisch für eine Vielzahl von Zellen (Johnson *et al.*, 1980; AlonsoDeValesco *et al.*, 1995). Lokalisiert im bakteriellen Zytosol wird es während der Vermehrung, vor allem aber während der Lyse der Bakterien freigesetzt (Boulnois, 1992). Dabei ist die Freisetzung aber nicht unbedingt an das Autolysin gebunden. Pneumolysin konnte in einigen Stämmen auch schon in der frühen Log-Phase unabhängig von LytA nachgewiesen werden (Balachandran *et al.*, 2001). Pneumolysin wirkt als Zytolysin, indem es kleine Poren in der eukaryotischen Zellmembran bildet und die Funktion der Phagozyten und Lymphozyten beeinträchtigt (Mitchell and Andrew, 1997). Außerdem greift es bronchiale Epithelzellen an, bei denen der Cilienschlag gehemmt und die Tight junctions zerstört



werden (Rayner *et al.*, 1995). Es aktiviert die Komplementkaskade und führt in humanen Monozyten zur Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Houldsworth *et al.*, 1994). Pneumolysin kann in hohen Konzentrationen sogar zur Lyse von Wirtszellen führen, indem es Transmembranporen in der Membran der Zellen verursacht (Paton *et al.*, 1996). Somit scheint Pneumolysin eine wichtige Rolle im frühen Stadium einer Infektion zu spielen und noch unbekannte Funktionen für die Virulenz zu haben (Alexander *et al.*, 1998; Berry *et al.*, 1999).

Weitere Zellwandantigene der Pneumokokken sind die **Teichonsäuren** (C-Polysaccharid), ein R-Antigen genanntes Protein, das den ebenso benannten Substanzen der  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken ähnelt. Die C-Substanz der Pneumokokken weist eine Partialantigengemeinschaft mit den **Lipoteichonsäuren** (Forssman-Antigen) auf und wird in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von einem  $\beta$ -Globulin des Serums präzipitiert, dem sogenannten C-reaktiven Protein (CRP). Das CRP ist bei akuten Entzündungen in erhöhter Menge nachweisbar und kann somit als ein Indikator für die Aktivität entzündlicher Prozesse dienen. Teichonsäure und Lipoteichonsäure stimulieren die Produktion von Interleukin-1 in Monozyten (Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989). Das Phosphorylcholin der Teichon- und Lipoteichonsäuren von Pneumokokken ist wesentlich an der nicht-kovalenten Verankerung von cholinbindenden Proteinen in der Zellwand beteiligt (Yother *et al.*, 1986).

Bei der Familie der **cholinbindenden Proteine** handelt es sich um Oberflächenproteine, die nicht-kovalent über die C-terminal lokalisierten Einheiten mit dem Cholin der Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren der Zellwand assoziiert sind (Yother und White, 1994; Rosenow C. *et al.*, 1997). Die Teichonsäure bindet an die N-Acetylmuraminsäuren des Peptidoglykangerüsts, während die Lipoteichonsäure in der Plasmamembran verankert ist (Schlegel, 1992).

**LytA**, das Autolysin der Pneumokokken, wurde als erstes cholinbindendes Protein beschrieben (Garcia *et al.*, 1986). Das LytA-Gen kodiert für das Pneumokokken-Autolysin N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase. Dieses führt zur Lyse der Bakterien in der stationären Wachstumsphase der Pneumokokken, die auch als Reaktion auf Penicillin ausgelöst werden kann. Im Verlauf einer Infektion führt die Autolyse der Pneumokokken zur Freisetzung des cytosolischen Virulenzfaktors Pneumolysin (Johnson, 1977). Autolysin-defiziente Mutanten sind in ihrer Virulenz im Mausexperiment deutlich reduziert (Berry *et al.*, 1989). Im Gegensatz zum Wildtyp

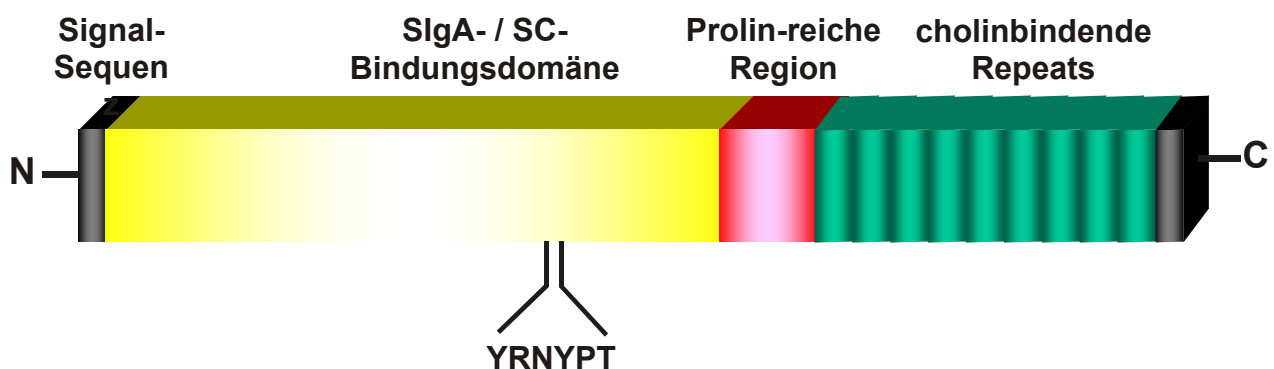
induzieren sie keine Entzündungsreaktion während der experimentellen Pneumonie (Canvin *et al.*, 1995). Die beiden Zellwandhydrolasen **LytB**, eine Glucosaminidase, und **LytC**, ein Lysozym, zeigten einen Einfluss auf die Kolonisierung und die Virulenz von Pneumokokken im Rattenmodell (Gosink *et al.*, 2000).

Das Oberflächenprotein **PspA** wurde als Bindungsprotein für das humane Eisentransportprotein Lactoferrin identifiziert (Briles *et al.*, 1988; Hammerschmidt *et al.*, 1999). Lactoferrin ist in den Sekreten der Schleimhäute zu finden und dient den Pneumokokken eventuell als Eisenquelle, was ihnen das Überleben in den mukosalen Epithelien ermöglichen könnte. PspA ist weiterhin an der Inhibition des Komplementsystems beteiligt (Talkington *et al.*, 1991; Tu *et al.* 1999). Es verhindert wahrscheinlich durch eine Interaktion mit dem Komplementfaktor B die Anlagerung von C3b an die Oberfläche der Pneumokokken, was die Komplement gesteuerte Lyse der Pneumokokken hemmt (Tu *et al.*, 1999).

Es gibt eine Vielzahl weiterer cholinbindender Proteine (Cbp), deren Funktion bisher aber weniger bekannt ist. So wurde zum Beispiel das sogenannte **PcpA** identifiziert, seine Funktion aber noch nicht aufgeklärt (Sanchez-Beato *et al.*, 1998). Im Jahr 2000 wurden schließlich sechs weitere Proteine, die dieser Familie angehören, beschrieben, die eine Rolle in der Virulenz von Pneumokokken spielen können. Es handelt sich dabei um die Proteine **CbpD**, **CbpE**, **CbpF**, **CbpG**, **CbpI** und **CbpJ** (Gosink *et al.*, 2000). Sie sind alle nicht-kovalent an das Phosphorylcholin der Bakterienzellwand gebunden und besitzen die charakteristischen cholinbindenden Repeats, bestehend aus je 20 Aminosäuren umfassenden Sequenzen, die im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert sind. CbpD und CbpE scheinen an der Adhärenz von Pneumokokken beteiligt zu sein, während CbpG, eine Serinprotease, sowohl an der Adhärenz als auch an der Invasion in Zellen beteiligt sein könnte (Gosink *et al.*, 2000). Für CbpE, eine Teichonsäure-Phosphorylesterase, konnte die Beteiligung an der Virulenz im Sepsis-Maus-Modell gezeigt werden (Vollmer und Tomasz, 2001).

Bei **SpsA** (*Streptococcus pneumoniae* secretory IgA binding protein) handelt es sich ebenfalls um ein cholinbindendes Protein. SpsA wurde außerdem unter den Namen CbpA (Cholin-binding protein A) (Rosenow *et al.*, 1997) und PspC (pneumococcal surface protein C) (Brooks-Walter *et al.*, 1999) beschrieben. Das *spsA*-Gen codiert für ein Polypeptid von 523 Aminosäuren Länge, welches ein Molekulargewicht von 56.151 Da besitzt (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Der ungeladene C-terminale

Bereich des Proteins besteht bei den meisten Typen aus 9 Repeats, die ausschließlich in diesen Oberflächenproteinen gefunden wurden. Sie sind für die Verankerung der Proteine auf der bakteriellen Zelloberfläche nötig (Yother und Briles, 1992). SpsA-Moleküle werden in zwei so genannte Clades unterteilt. Clade A und Clade B sind unterschiedliche Varianten des Proteins. Der Clade A besitzt eine repetitive Sequenz im N-terminalen Bereich des Proteins. In Clade B ist die Sequenz nur einmal vorhanden (Brooks-Walter *et al.*, 1999).



**Abbildung 2:** Modell des SpsA Proteins aus dem Typ 1 Stamm ATCC 33400.

SpsA konnte als bakterielles Adhäsins für die sekretorische Komponente (SC) und das sekretorische Immunglobulin A (SlgA) identifiziert werden (Hammerschmidt *et al.*, 1997). SlgA repräsentiert den wichtigsten Abwehrfaktor gegen Infektionserreger (Underdown und Schiff, 1986). Die SlgA- oder SC-bindende Domäne wurde im N-terminalen Bereich des SpsA detektiert. Als Bindungsmotiv konnte das Hexapeptid YRNYPT identifiziert werden, wobei die drei Aminosäuren YPT für die Bindung an SC und SlgA essentiell sind (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Die Dissoziationskonstante der SlgA-Bindung an SpsA beträgt  $9,3 \times 10^{-9}$  M. Die Interaktion zwischen SlgA und freier SC mit SpsA ist humanspezifisch, da SlgA und freie SC aus Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen nicht an SpsA binden (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Trotz der in verschiedenen Serotypen der Pneumokokken auftretenden Variationen des SpsA, wurde die Expression von SpsA und die Bindung an SC in mindestens 73 % der getesteten Pneumokokken Isolate nachgewiesen (Hammerschmidt *et al.*, 1997). SpsA ist der einzige

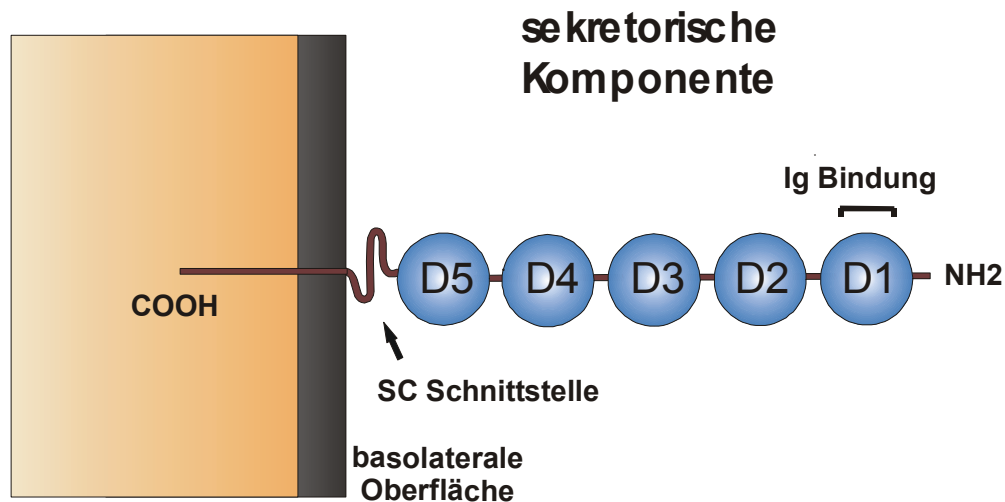
Pneumokokkenrezeptor für SIgA. Die Bindung des sekretorischen IgA erfolgt über die sekretorische Komponente, den extrazellulären Teil des polymeren Immunglobulin Rezeptors (pIgR), der an polymeres IgA gebunden ist. Serum IgA kann von *Streptococcus pneumoniae* nicht gebunden werden.

## 2.8 Der polymere Immunglobulin Rezeptor

SIgA ist das wichtigste Immunglobulin in humanen Sekreten (Heremans, 1974) und wirkt als wichtiger adaptiver Faktor für die Immunabwehr in der Schleimhaut (Underdown und Schiff, 1986). IgA wird von Plasmazellen in der Lamina Propria der Schleimhäute synthetisiert und kommt in drei Formen vor. Entweder als Monomer, als Dimer, das aus zwei durch eine sogenannte J-Kette verbundenen Monomeren besteht, oder als Dimer, das mit einer sekretorischen Komponente verbunden ist. IgA findet sich in hohen Konzentrationen in Sekreten. Im Serum kommt es hauptsächlich als Dimer vor und hat eine Halbwertszeit von sechs Tagen. IgA übt seine Abwehrfunktion hauptsächlich auf den Schleimhautoberflächen der Atemwege sowie des Darm- und des Urogenitalsystems aus. Das IgA-Dimer wird über respiratorische und intestinale Schleimhautbarrieren in das Lumen transportiert (Solari und Kraehenbuhl, 1984). Dies geschieht mit Hilfe der sekretorischen Komponente des humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptors, der an der basolateralen Oberfläche von Schleimhautepithelzellen exprimiert wird und der die Fc-Region des IgA erkennt (Brandtzaeg und Prydz, 1984). Dimeres IgA und pentameres IgM wird für den Transport kovalent an den pIgR gebunden. Der Komplex wird durch Transzytose durch die Epithelzellen transportiert und in die mukosalen Sekrete entlassen. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors, bekannt als sekretorische Komponente (SC), wird auf der apikalen Oberfläche proteolytisch abgespalten (Kilian *et al.*, 1988). Er wird entweder als freie SC oder als Komplex, gebunden an dimeres IgA, freigesetzt (Fallgreen-Gebauer *et al.*, 1993).

Bei dem polymeren Immunglobulin Rezeptor handelt es sich um einen Transmembranrezeptor, bestehend aus einem extrazellulären Bereich, einem 23 Aminosäuren langen membrandurchspannenden Teil und einer cytoplasmatischen C-terminalen Domäne, die aus 103 Aminosäuren besteht. Der extrazelluläre Teil

besteht aus fünf homologen Domänen, die je aus 100 bis 110 Aminosäuren bestehen.



**Abbildung 3:** Modell des polymeren Immunglobulinrezeptors, bestehend aus fünf extrazellulären Domänen, der Transmembranregion sowie der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne

Diese Domänen gehören zur Familie der Immunglobulin Superfamilie (Mostov *et al.*, 1984; Banting *et al.*, 1989). Um die zu transzytierenden Verbindungen von solchen zu unterscheiden, die für den lysosomalen Abbau oder für den Rücktransport zur Zelloberfläche bestimmt sind, werden sie in den frühen Endosomen sortiert (Sztul, 1991).

Der pIgR wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zum Golgi-Apparat transportiert. Im sogenannten *trans*-Golgi network (TGN) werden Proteine, die für den Transport an Zelloberflächen bestimmt sind, erkannt und in Transportvesikel verpackt. Von dort aus werden sie in Richtung der basolateralen Membran sortiert, wofür eine Sequenz von 14 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne in der Nähe der Transmembransequenz notwendig ist (Casanova *et al.*, 1991). Der pIgR wird zur basolateralen Oberfläche transportiert, wo er dimeres IgA oder pentameres IgM binden kann. Er wird in Endosomen internalisiert, und die Vesikel wurden durch Transzytose zur apikale Oberfläche befördert. Für die Internalisierung an der basolateralen Zelloberfläche sind zwei Tyrosin-Reste der cytoplasmatischen Domäne von Bedeutung (Okamoto *et al.*, 1992). Nach der Internalisierung erfolgt die Sortierung in transcytotische Vesikel, an der die Aminosäuren 670 – 707 des

cytoplasmatischen Teils, sowie die Phosphorylierung von Serin-664 beteiligt sind (Breitfeld *et al.*, 1990). Durch proteolytische Spaltung wird der extrazelluläre Teil des Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 80 kDa abgetrennt (SC oder SIgA) (Mostov *et al.*, 1984; Underdown und Schiff, 1986; Kraehenbuhl und Neutra, 1992). Die Halbwertszeit des plgA-Rezeptors beträgt etwa 1,1 h und ist damit deutlich kürzer als jene von Plasmamembran-Proteinen, die im Bereich von 4 - 9 Tagen liegt (Scott und Hubbard, 1992). Sekretiertes dIgA, das kovalent an die sekretorische Komponente assoziiert ist, nennt man auch sekretorisches IgA. Die Assoziation mit der sekretorischen Komponente schützt SIgA-Antikörper vor der proteolytischen Degradation (Kaetzel, 2001). Nach der Transzytose in das mukosale Lumen wirkt das sekretierte SIgA als immunologische Barriere, die die Adhärenz und Invasion von Mikroorganismen an die Epithelzellen verhindern soll. Außerdem kann polymeres IgA Viren und wahrscheinlich auch Bakterien intrazellulär, während des plgR-vermittelten Transports neutralisieren. Große Immunkomplexe und wahrscheinlich auch Mikroorganismen, die mit polymerem IgA gekoppelt sind, können vom plgR von Basal wieder nach Apikal transportiert werden. Dadurch verhindert SIgA die Anlagerung und Invasion dieser externen Pathogene in die Schleimhaut (Outlaw und Dimmock, 1990; Enriquez und Riggs, 1998). Der plgR spielt also eine wichtige Rolle beim Transport von sekretorischem Immunglobulin, das bakterielle und virale Adhärenz und Vermehrung unterbinden soll. Der plgR wird auch unbeladen von der basalen zur apikalen Zelloberfläche transportiert, wo die freie sekretorische Komponente (SC) abgespalten wird. Für die Transzytose des Rezeptors ohne Liganden ist dabei die Phosphorylierung eines Serinrests der cytoplasmatischen Domäne (Ser-664) notwendig, die nicht beobachtet wurde, wenn der Rezeptor einen Liganden gebunden hatte (Hirt *et al.*, 1993).

Die sekretorische Komponente könnte ebenfalls eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Pneumokokken spielen, indem sie an das SpsA der Bakterien bindet und so die Adhärenz der Pneumokokken an den plgR auf den mukosalen Epithelzellen blockiert (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Kaetzel, 2001). Weiterhin kann der Rezeptor auch auf der apikalen Oberfläche internalisiert und zur basolateralen Oberfläche transportiert werden. Dieser Weg ist aber weniger effizient als der Transport von Basal nach Apikal.

Der beschriebene Mechanismus kann von einigen pathogenen Bakterien als Eintrittspforte in Epithelzellen genutzt werden (Zhang *et al.*, 2000). *Streptococcus*

*pneumoniae* bindet mittels SpsA an den plgR. Durch die Internalisierung des SpsA-plgR Komplexes könnten die Bakterien in Epithelzellen aufgenommen und von der apikalen Oberfläche zur basolateralen Seite transportiert werden.

Drei Faktoren sollten eigentlich die plgR-vermittelte Internalisierung der Pneumokokken verhindern; zum einen die proteolytische Trennung der SC von der apikalen Oberfläche, dann der ineffiziente Transport des Rezeptors von Apikal nach Basal, und schließlich die zur Verfügung gestellten Antikörper auf der apikalen Seite der Epithelzellen (Kaetzel, 2001). Trotzdem scheinen Pneumokokken genau diesen Weg über den plgR zu nehmen (Zhang *et al.*, 2000).

plgR-negative Mäuse zeigten eine reduzierte Kolonisation von *Streptococcus pneumoniae* im Nasopharynx im Vergleich zu WT-Mäusen. Ebenso zeigten Mäuse mit fehlender Tyrosin Kinase p62<sup>yes</sup>, die für die normale plgR Transzytose gebraucht wird, im Vergleich zu WT-Mäusen ein verzögertes Auftreten von Bakteriämie (Luton *et al.*, 1999).

Für das Epstein-Barr-Virus (EBV) konnte gezeigt werden, dass plgA-Antikörper dessen Eintritt in Epithelzellen durch plgR-vermittelte Endozytose unterstützen (Sixbey und Yao, 1992; Gan *et al.*, 1997). EBV ist in der Lage, plgR exprimierende Nasopharynxzellen in Anwesenheit von polymerem IgA zu infizieren, aber nicht in dessen Abwesenheit (Lin *et al.*, 1997 und 2000).

Mäuse, die die sogenannte J-Kette nicht produzieren können, zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen seltener eine Herpes Simplex Virus Infektionen (Hendrickson *et al.*, 2000). Sie können polymere Immunglobuline nicht mehr über die Kette miteinander verbinden, wodurch keine plgR vermittelte Transzytose mehr möglich ist.

## 2.9 Ziele dieser Arbeit

In vorhergehenden Arbeiten war gezeigt worden, dass das Oberflächenprotein SpsA von *Streptococcus pneumoniae* an die sekretorische Komponente bzw. an sekretorisches IgA binden kann (Hammerschmidt *et al.*, 1997).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des SpsA als Adhäsion und Invasin für verschiedene mukosale Epithelzellen auf zellbiologischer Ebene zu analysieren. Internalisierung und Transmigration der Pneumokokken sollten auf polarisierten mukosalen Epithelzellen im Zwei-Kammer-System mit Hilfe der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie analysiert werden. Des Weiteren sollte die Rolle des SpsA-

Rezeptors auf der eukaryotischen Seite untersucht werden. Chimere SC-Moleküle bestehend aus humanen SC-Domänen sowie Domänen der Maus sollten hergestellt werden, um das Bindungsmotiv für SpsA im Rezeptor einzugrenzen. Schließlich sollte das minimale SpsA-Bindungsmotiv im humanen plgR identifiziert werden.



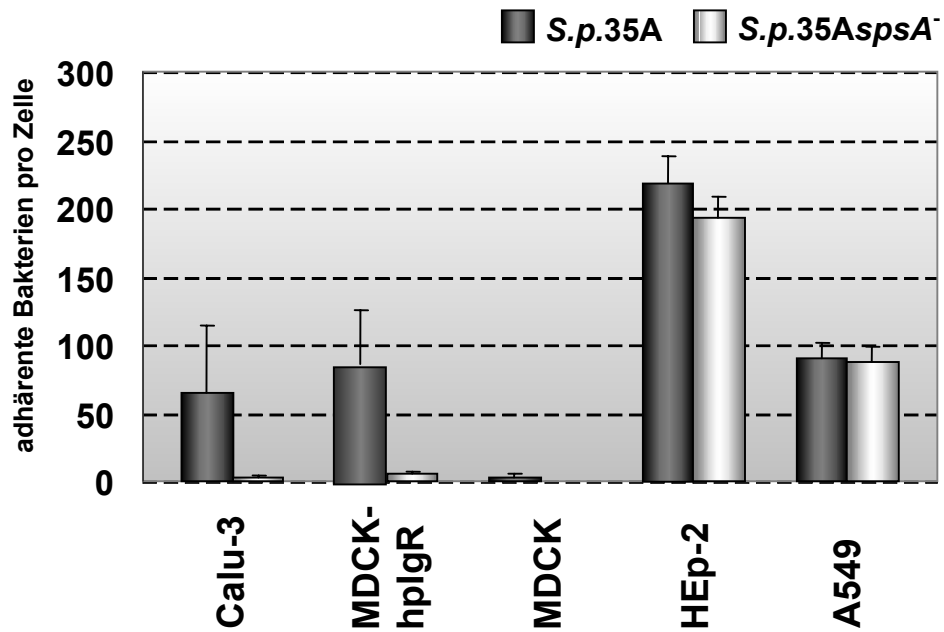
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Interaktion des cholinbindenden Proteins SpsA mit SC/SlgA

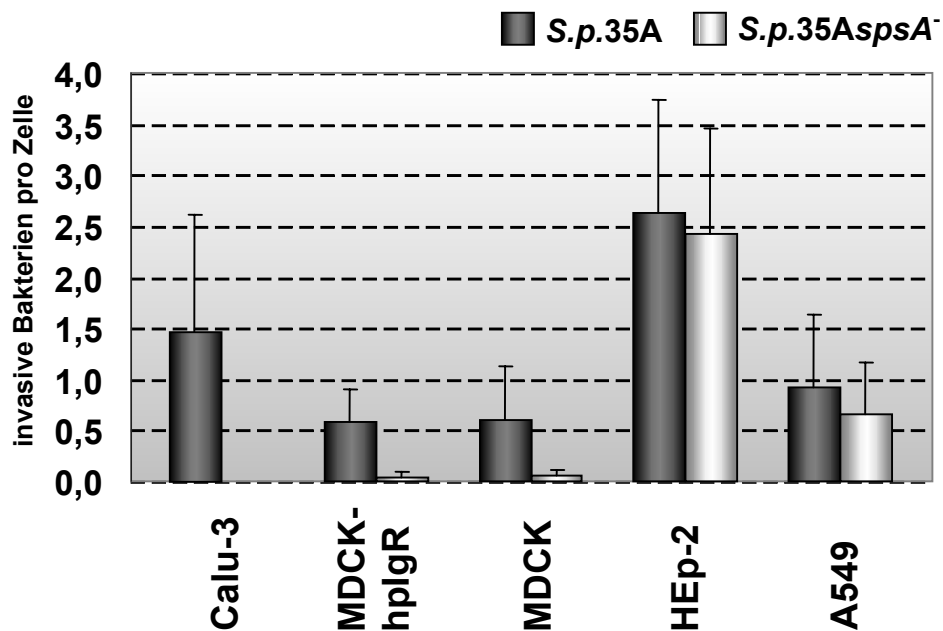
#### 3.1.1 SpsA vermittelte Adhärenz und Invasion an mukosale Epithelzellen

*Streptococcus pneumoniae* besiedelt als Kommensale den respiratorischen Trakt des Menschen und ist in der Lage im Gewebe zu kolonisieren. Durch das Eindringen in Epithel- und Endothelzellen verursachen Pneumokokken invasive Erkrankungen. Die Expression verschiedener Virulenzfaktoren ermöglicht es den Bakterien mit humanen Zellen zu interagieren und in das Innere der Zellen zu gelangen. Ein Virulenzfaktor der Pneumokokken ist das SpsA, das als sekretorisches Immunglobulin A (SlgA) bindendes Protein beschrieben wurde. Die Interaktion erfolgt über die sekretorische Komponente des sekretorischen IgA, die den extrazellulären Teil des humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptors repräsentiert (Hammerschmidt *et al.*, 1997).

Der Einfluss des bakteriellen Oberflächenproteins SpsA auf die Adhärenz und Invasion von *Streptococcus pneumoniae* an bzw. in humane Epithelzellen wurde in Infektionsversuchen mit verschiedenen epithelialen Zelllinien analysiert. Die Infektionen wurden mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 35A (NCTC 10319) sowie der entsprechenden *spsA*-negative-Mutante dieses Stammes durchgeführt. Dieser Wildtypstamm und die Mutante werden im folgenden als *S.p.35A* und *S.p.35A<sub>spsA</sub><sup>-</sup>* bezeichnet. Zur Bestimmung der Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien auf den Zellen wurde nach den Infektionsversuchen eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt, bei der invasive Pneumokokken mit dem Fluorochrom Alexa-568 und adhärente mit den beiden Fluorochromen Alexa-488 und Alexa-568 markiert wurden. Adhärente Bakterien erschienen in der Fluoreszenzmikroskopie durch Überlagerung des grünen und des roten Farbstoffs mit einem entsprechenden Filter als gelbe Kokken, während invasive Bakterien rot leuchteten. Die Anzahl adhärenter und invasiver Pneumokokken wurde mikroskopisch durch Auszählen auf jeweils mindestens 50 Zellen bestimmt.



**Abbildung 4:** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A (schwarz) und S.p.35AspsA<sup>-</sup> (grau) an Lungenepithelzellen (Calu-3), hplgR produzierende Nierenepithelzellen (MDCK-hplgR), Wildtyp Nierenepithelzellen (MDCK), humane Larynx-Karzinomzellen (HEp-2) und humane alveoläre Lungenepithelzellen (A549).



**Abbildung 5:** Invasion von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A (schwarz) und S.p.35AspsA<sup>-</sup> (grau) in die Epithelzelllinien Calu-3, MDCK-hplgR, MDCK, HEp-2 und A549.

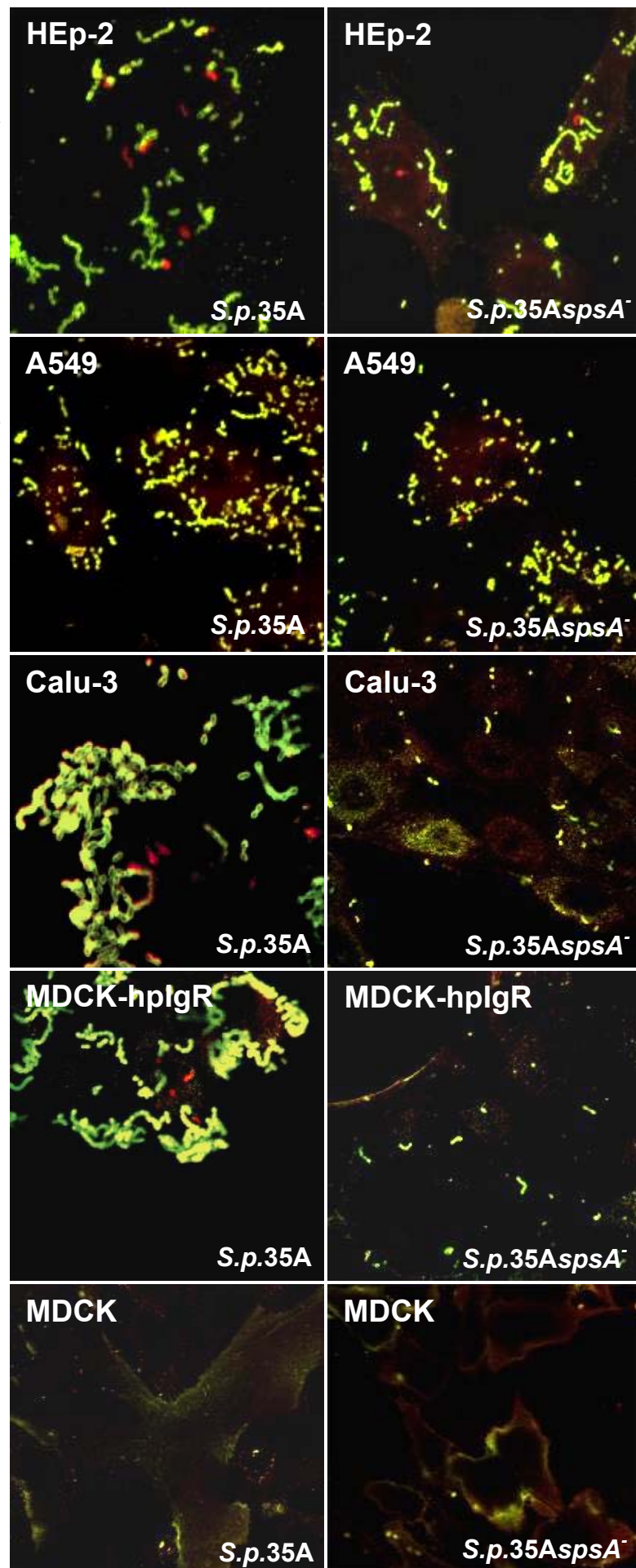
| Zelllinie  | Adhärente Bakterien pro Zelle |                                | Invasive Bakterien pro Zelle |                                |
|------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
|            | <i>S.p.35A</i>                | <i>S.p.35AspsA<sup>-</sup></i> | <i>S.p.35A</i>               | <i>S.p.35AspsA<sup>-</sup></i> |
| Calu-3     | 65,4 ± 49,1                   | 2,6 ± 1,4                      | 1,4 ± 1,1                    | 0 ± 0                          |
| MDCK-hplgR | 85,9 ± 39,3                   | 5,3 ± 2,5                      | 0,5 ± 0,3                    | 0,04 ± 0,05                    |
| MDCK       | 2,85 ± 2,36                   | 0,2 ± 0,3                      | 0,6 ± 0,5                    | 0,06 ± 0,05                    |
| HEp-2      | 218,8 ± 19,6                  | 193,4 ± 15,4                   | 2,6 ± 1,1                    | 2,4 ± 1,0                      |
| A549       | 90,7 ± 10,5                   | 86,8 ± 11,9                    | 0,9 ± 0,7                    | 0,6 ± 0,5                      |

**Tabelle 1:** Anzahl der adhärenenten und invasiven Bakterien pro Zelle nach der Infektion verschiedener Epithelzellen mit den *S. pneumoniae* Stämmen *S.p.35A* und *S.p.35AspsA<sup>-</sup>*.

Adhärenz und Invasion des *spsA*-defizienten Pneumokokken-Stamms sind auf HEp-2 und A549 Zellen im Vergleich zum Wildtypstamm nicht signifikant beeinflusst. Die *spsA*-Mutante zeigt nur eine geringe Reduktion der Adhärenz an die beiden epithelialen Zelllinien. Bei Calu-3 und MDCK-hplgR, die stabil mit dem hplgR transfiziert waren, zeigt die Mutante eine drastische Reduktion der Adhärenz an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Adhärenz an Calu-3 Zellen um etwa das 100fache reduziert. Die Adhärenz an MDCK-hplgR Zellen ist um 95 % verringert. Die *spsA*-Mutante zeigte auf Calu-3 keine Fähigkeit mehr zur Invasion. Auf MDCK-hplgR Zellen ist die Zahl der internalisierten Bakterien um 92 % reduziert. Adhärenz und Invasion von beiden Stämmen ist auf MDCK Zellen, die den Rezeptor nicht exprimieren, zu vernachlässigen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen geben einen visuellen Eindruck der Adhärenz und Invasion von *Streptococcus pneumoniae* auf verschiedenen Epithelzellen. A549, HEp-2, Calu-3, MDCK und MDCK-hplgR Zellen wurden mit dem parentalen Stamm *S.p.35A* (NCTC 10319) sowie der entsprechenden *spsA*-Mutante 4 Stunden infiziert. Adhärente und invasive Bakterien konnten nach Fluorochrommarkierung im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Der *spsA*-defiziente Stamm ist in der Adhärenz und Invasion an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen im Vergleich zum parentalen Stamm *S.p.35A* stark reduziert. Auf HEp-2 und A549 Zellen konnte für *S.p.35AspsA<sup>-</sup>* kein Unterschied im Adhärenz- und Invasionsverhalten festgestellt werden. MDCK Zellen zeigten keine Interaktion mit *Streptococcus pneumoniae*. Bei den MDCK Zellen handelt es sich um Nierenzellen aus dem Hund, die im Fall der MDCK-hplgR mit cDNA transfiziert waren, die für den humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptor codierte.

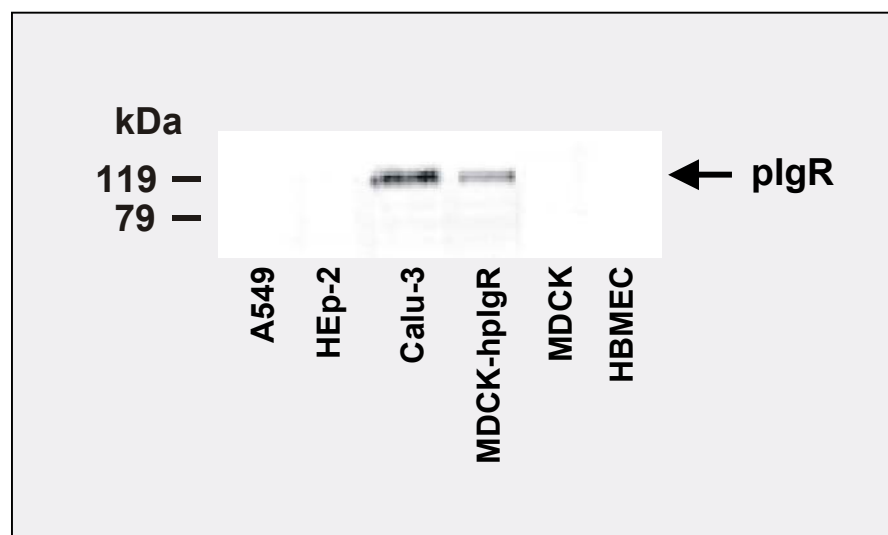
**Abbildung 6:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Adhärenz und Invasion von *Streptococcus pneumoniae* an die Epithelzelllinien A549, HEp-2, Calu-3, MDCK-hplgR und MDCK. Adhärenz Bakterien sind grün-gelb angefärbt und invasive Pneumokokken leuchten rot. Die Bilder auf der linken Seite zeigen die Infektion mit dem parentalen Stamm *S.p.35A* (NCTC 10319). Auf der rechten Seite sind die Zellen mit der entsprechenden *spsA*-Mutante inkubiert.



### 3.1.2 Expression des polymeren-Ig Rezeptors in humanen Epithelzellen

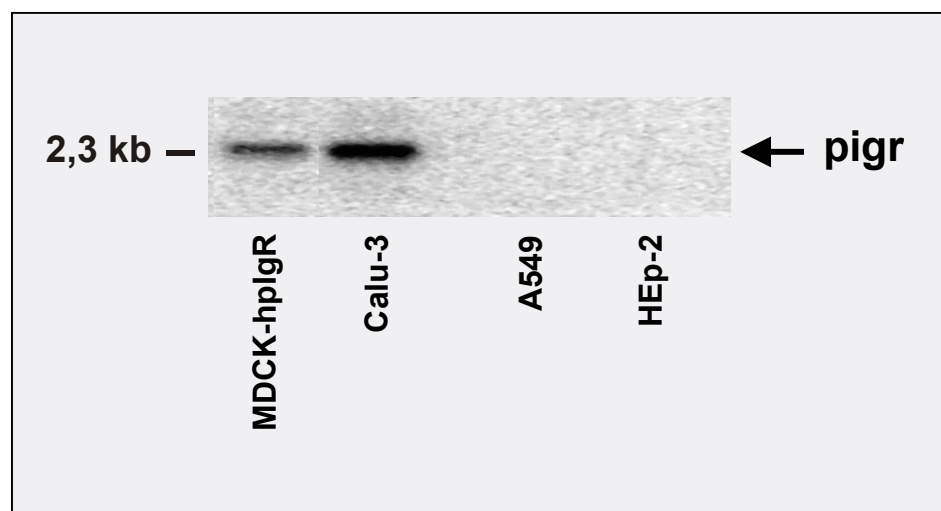
Da nur bei Calu-3 und den MDCK-hplgR Zellen eine SpsA-vermittelte Interaktion mit humanen Epithelzellen beobachtet worden war, wurden verschiedene Zelllinien des Respirationstrakts und der Blut-Hirn-Schranke auf die Expression von humanem polymerem Immunglobulin-Rezeptor untersucht. Die Epithelzellen A549, HEp-2 und Calu-3 sowie die humanen Hirnendothelzellen HBMEC (human brain-derived microvascular endothelial cells) wurden im Immunblot auf die Expression des Rezeptors getestet. Als Negativ-Kontrolle wurden die Nierenepithelzellen aus dem Hund (MDCK) eingesetzt, und als Positiv-Kontrolle MDCK Zellen, die den Rezeptor stabil exprimierten. Die Zelllysate der verschiedenen Zelllinien wurden auf einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt, und die Proteine nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran im Immunblot mit anti-SC Antikörper auf die Produktion des plgR untersucht. Für Calu-3 und MDCK-hplgR konnte die Expression eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 119 kDa nachgewiesen werden (Abb. 7). A549, HEp-2 und HBMEC zeigten, ebenso wie MDCK Zellen die nicht mit der für den Rezeptor kodierenden cDNA transfiziert waren, keine Produktion des Rezeptors.



**Abbildung 7:** Detektion der Expression des polymeren Immunglobulin-Rezeptors durch Reaktion von Zelllysaten der Zelllinien 1: A549; 2: HEp-2; 3: Calu-3; 4: MDCK-hplgR; 5: MDCK; 6: HBMEC mit anti-SC-Antiserum.

Die Genexpression wurde anhand der isolierten mRNA aus den Zelllinien HEp-2, A549, Calu-3 und MDCK-hpIgR analysiert. Jeweils 100 ng der mRNA wurden auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die mRNA wurde auf eine N<sup>+</sup>-Nylonmembran übertragen und mit einer <sup>32</sup>P-gekoppelten *pigr*-DNA-Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Für die *pigr*-Sonde wurde aus der mRNA der Calu-3 Zellen unter Verwendung der M-MLV reversen Transkriptase die cDNA der Zellen synthetisiert. Diese cDNA wurde als Template für eine PCR mit den Oligonukleotiden IGR1 und IGR2 (Tabelle 15) verwendet, die ein 364 Basenpaare großes DNA-Fragment aus dem *pigr* synthetisierten. Das PCR-Produkt wurde mit <sup>32</sup>P markiert und für die Hybridisierung verwendet.

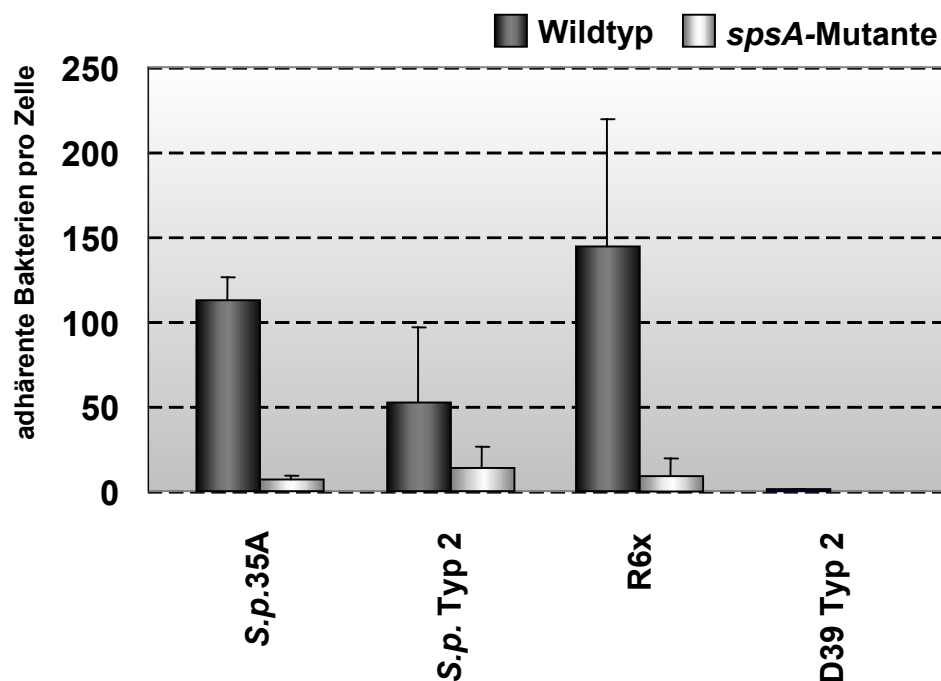
Für Calu-3 Zellen sowie die stabil exprimierenden MDCK-hpIgR Zellen konnte die Transkription des *pigr*-Gens mit einer Größe von 2,3 kb nachgewiesen werden. HEp-2 und A549 zeigten jedoch keine Expression der RNA für den Rezeptor. Die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass auf der bakteriellen Seite das SpsA und auf der eukaryotischen Seite der hpIgR an der Bindung von Pneumokokken an Epithelzellen beteiligt ist.



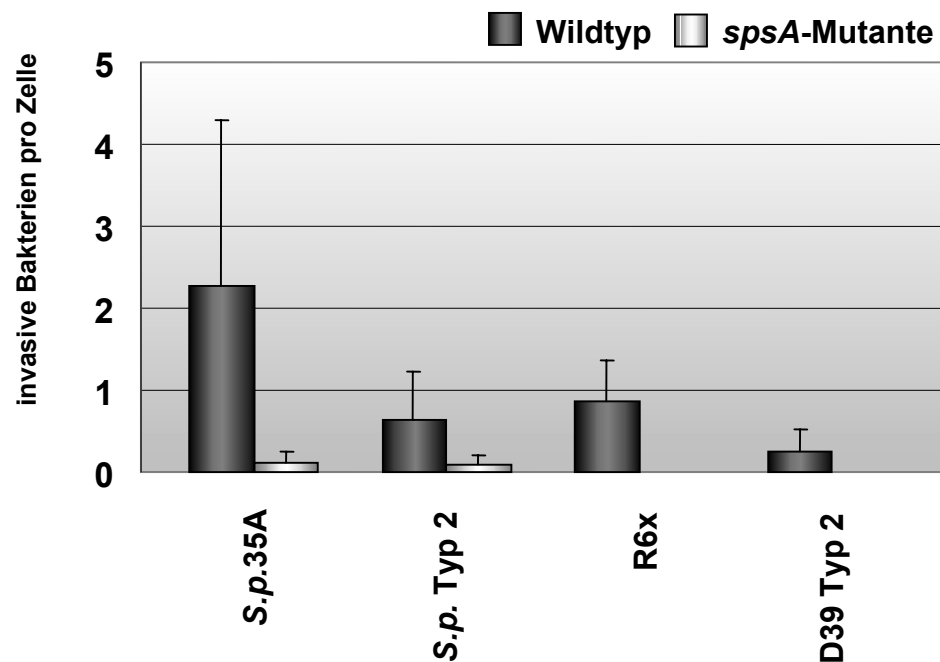
**Abbildung 8:** Detektion der Expression der mRNA für den polymeren Immunglobulin-Rezeptors im Northernblot mit einer *pigr*-DNA-Sonde. Untersuchung der epithelialen Zelllinien MDCK-hpIgR, Calu-3, A549 und HEp-2.

### 3.1.3 Untersuchungen zur Serotyp- und Stamm-spezifischen Adhärenz an plgR produzierende Epithelzellen von *Streptococcus pneumoniae*

Der *S. pneumoniae* Serotyp 35A (NCTC10319) zeigte eine SpsA-vermittelte Adhärenz und Invasion bei plgR produzierenden mukosalen Epithelzellen. Der Einfluss des Serotyps auf diese Interaktion wurde durch einen Vergleich der Adhärenz und Invasion von verschiedenen Pneumokokken Stämmen analysiert. Der ATCC Stamm 11733, ein bekapselter Serotyp 2 Stamm (P51), der Stamm D39, ebenfalls ein Serotyp 2, und das unbekapselte Derivat R6x vom Stamm D39 wurden für die Infektionsversuche verwendet. Die Infektion von plgR-produzierenden Epithelzellen erfolgte mit jeweils  $10^7$  Pneumokokken für 4 Stunden. Die adhärenenten und invasiven Bakterien wurden nach der Fluorochrommarkierung mikroskopisch auf mindestens 50 Zellen ausgezählt.



**Abbildung 9** :Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* an die plgR-exprimierende Zelllinie MDCK-hplgR. Die Adhärenz der Wildtypstämme (schwarz) sowie deren *spsA*-Mutanten (grau) wurde durch Auszählung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die Zellen wurden mit Typ 35A (NCTC 10319), mit den bekapselten *S. pneumoniae* Typ 2 Stämmen ATCC 11733 und D39 und dem unbekapselten R6x sowie deren *spsA*-Mutanten infiziert.



**Abbildung 10 :** Invasion von *Streptococcus pneumoniae* in die plgR-exprimierende Zelllinie MDCK-hplgR. Die Zellen wurden mit Typ 35A (NCTC 10319), mit den bekapselten *S. pneumoniae* Typ 2 Stämmen ATCC 11733 und D39 und dem unbekapselten R6x sowie deren *spsA*-Mutanten infiziert.

| <i>S. pneumoniae</i> Stamm | Adhärente Bakterien pro Zelle |                      | Invasive Bakterien pro Zelle |                      |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
|                            | Wildtyp                       | <i>spsA</i> -Mutante | Wildtyp                      | <i>spsA</i> -Mutante |
| S.p.35A (NCTC 10319)       | 112,1 ± 14,3                  | 7,3 ± 1,6            | 2,3 ± 2,0                    | 0,1 ± 0,1            |
| S.p. Typ2 (ATCC 11733)     | 52,1 ± 44,7                   | 13,3 ± 12,5          | 0,6 ± 0,6                    | 0,1 ± 0,1            |
| R6x                        | 144,6 ± 75,2                  | 9,1 ± 9,7            | 0,9 ± 0,5                    | 0 ± 0                |
| D39 Typ 2                  | 0,8 ± 0,4                     | 0,06 ± 0,08          | 0,3 ± 0,3                    | 0 ± 0                |

**Tabelle 2:** Anzahl der adhärenenten und invasiven Bakterien pro Zelle nach der Infektion der hplgR produzierenden MDCK Zellen mit verschiedenen Pneumokokkenstämmen. Die Zellen waren mit *S. pneumoniae* S.p.35A (NCTC 10319), S.p.Typ2 (ATCC 11733), D39 und dem unbekapselten R6x sowie deren *spsA*-Mutanten infiziert worden.

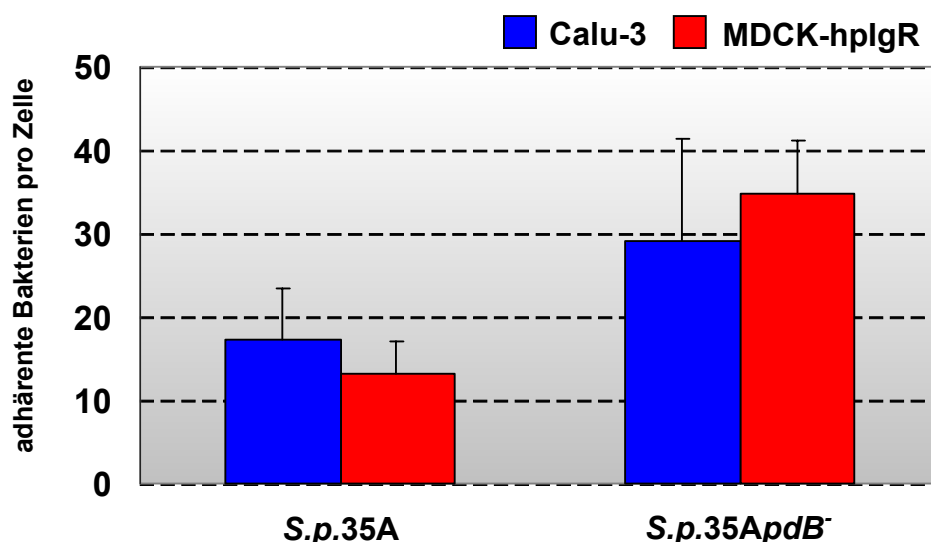
Die Wildtypstämme S.p.35A und R6x binden mit 112 bzw. 144 Bakterien pro Zelle. Die *spsA*-Mutanten dieser Stämme zeigten dagegen mit etwa 7 und 9 Bakterien pro Zelle eine signifikant verringerte Adhärenz (Abb. 9). Der parentale Stamm S.p.Typ 2 (ATCC 11733) zeigte mit 52 Bakterien pro Zelle im Vergleich zu Stamm S.p.35A und



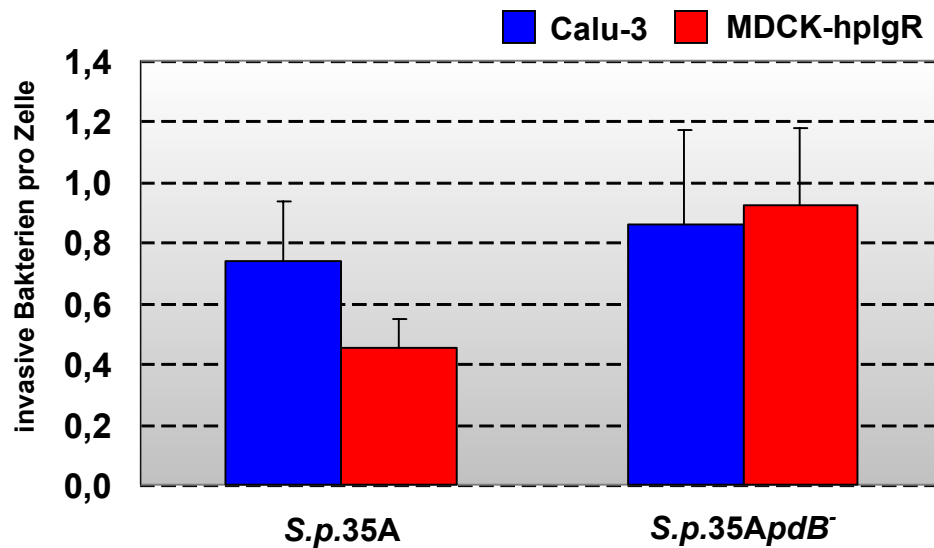
R6x eine geringere Bindung an die Epithelzellen. Die Adhärenz der *spsA*-Mutante dieses Stamms war um etwa 75 % reduziert. Der Mausvirulente *S. pneumoniae* Stamm D39 zeigt bereits als Wildtyp eine sehr geringe Fähigkeit zur Adhärenz an MDCK-hplgR Zellen. 0,8 Bakterien pro Zellen konnten an die plgR produzierenden Zellen binden, während für die *spsA*-Mutante weniger als 0,1 Bakterien pro Zelle gezählt werden konnten. Die *spsA*-Mutanten der untersuchten Stämme wiesen eine deutliche Reduktion der Internalisierung in die Zellen auf. Bei der Infektion mit dem Stamm D39 wurden weder für den Wildtyp noch für die Mutante invasive Bakterien nachgewiesen. Die Interaktion zwischen dem Oberflächenprotein SpsA und dem plgR scheint bei den untersuchten *S. pneumoniae* Stämmen entscheidend für die Anheftung an die Zelle und die folgende Internalisierung zu sein.

#### 3.1.4 Einfluss von Pneumolysin auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten von Pneumokokken bei hplgR exprimierenden Epithelzellen

Pneumolysin wird von nahezu allen klinischen Pneumokokken-Isolaten produziert und schädigt Epithelzellen während der Infektion (Mitchell and Andrew, 1997; Braun *et al.*, 2002). Durch die Infektion von Calu-3 und MDCK-hplgR mit dem Stamm *S.p.35A* sowie seiner Pneumolysin-defizienten Mutante sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung von Pneumolysin die Adhärenz und Invasion beeinflusst.



**Abbildung 11 :** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* an die plgR-exprimierenden Zelllinien Calu-3 (blau) und MDCK-hplgR (rot). Die Adhärenz der Pneumokokkenstämme *S.p.35A* (NCTC 10319) und *S.p.35ApdB<sup>-</sup>* wurde durch Auszählung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.



**Abbildung 12 :** Invasion der *Streptococcus pneumoniae* Stämme S.p.35A (NCTC 10319) und S.p.35ApdB<sup>-</sup> in die plgR-exprimierenden Zelllinien Calu-3 (blau) und MDCK-hplgR (rot).

| Zelllinie  | Adhärenzte Bakterien pro Zelle |                         | Invasive Bakterien pro Zelle |                         |
|------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|
|            | S.p.35A                        | S.p.35ApdB <sup>-</sup> | S.p.35A                      | S.p.35ApdB <sup>-</sup> |
| Calu-3     | 17,28 ± 6,08                   | 29,19 ± 12,06           | 0,74 ± 0,19                  | 0,86 ± 0,31             |
| MDCK-hplgR | 13,14 ± 3,85                   | 34,88 ± 6,22            | 0,45 ± 0,09                  | 0,92 ± 0,25             |

**Tabelle 3:** Anzahl der adhärenzten und invasiven Bakterien pro Zelle nach der Infektion der hplgR produzierenden Zelllinien Calu-3 und MDCK-hplgR. Die Zellen waren mit dem *S. pneumoniae* Stamm S.p.35A sowie seiner Pneumolysin-negativen Mutante (S.p.35ApdB<sup>-</sup>) infiziert worden.

Pneumolysin-negative Pneumokokken zeigten im Vergleich zu ihrem Wildtypstamm im Infektionsversuch eine signifikante Steigerung der Adhärenz an hplgR exprimierende Zellen (Abb. 12 und 13). Der Pneumolysin-defiziente Stamm zeigte eine um 70 % gesteigerte Adhärenz an Calu-3 Zellen. Auf MDCK-hplgR konnten etwa drei Mal so viele Pneumolysin-negative Pneumokokken an die Zellen binden, wie es für den Wildtyp Stamm gezählt wurde. Die Invasion von Stamm S.p.35ApdB<sup>-</sup> an Calu-3 Zellen war im Vergleich zum parentalen Stamm von 0,74 Bakterien pro Zelle auf 0,86 Bakterien pro Zelle erhöht. Auf MDCK-hplgR Zellen konnte eine um etwa 50 % gesteigerte Internalisierung der Mutante beobachtet werden.

Im Infektionsversuch hatte die Inaktivierung des bakteriellen Pneumolysin einen deutlichen Einfluss auf die Adhärenz und Invasion von Epithelzellen. Sowohl Adhärenz als auch Invasion waren gesteigert, da kein cytotoxisches Pneumolysin freigesetzt wurde und dadurch die Zellen nicht mehr geschädigt werden konnten. In weiteren Zellkulturversuchen wurde der Pneumolysin-negative Stamm (im Folgenden *S.p.35A* bezeichnet) als Referenzstamm verwendet, um die SpsA-plgR assoziierte Adhärenz und Invasion zu untersuchen.

### 3.1.5 Inhibition der Adhärenz an und Invasion von Pneumokokken in hplgR-produzierende Zellen

Die *spsA*-defiziente Mutante des *Streptococcus pneumoniae* Stamm *S.p.35A* (NCTC10319) zeigte im Vergleich zum Wildtypstamm eine signifikant schwächere Bindung an die hplgR exprimierenden Epithelzellen Calu-3 und MDCK-hplgR. Die Funktion des bakteriellen Oberflächenproteins SpsA als Adhäsion wurde in Inhibitionsversuchen mit rekombinanten SpsA-Derivaten und mit anti-SpsA Antiserum in der *in vitro* Infektion epithelialer Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit SpsA-SH2, einem C-terminal verkürzten Protein-Fragment, welches keine cholinbindenden Repeats und Signalsequenz besitzt, präinkubiert. Des Weiteren erfolgte die Inkubation mit dem mutierten SpsA<sup>201</sup>, bei dem an Aminosäureposition 201 ein Tyrosin gegen ein Aspartat ausgetauscht war. Das Hexapeptid YRNYPT in SpsA wurde als das minimale Bindungsmotiv für den humanen plgR lokalisiert sowie das Tyrosin als essentielle Aminosäure (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Zur Inhibition der Adhärenz wurden die Zellen mit den Proteinen für 30 min bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Infektion mit  $1 \times 10^7$  Bakterien erfolgte für 4 Stunden in Gegenwart der Proteine. Zur Kontrolle wurden die Zellen im Parallelansatz mit Pneumokokken infiziert, die weder mit Antikörper noch mit Protein präinkubiert worden waren. Außerdem wurde als Kontrolle die Infektion der Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen mit der *spsA*-defizienten Mutante durchgeführt.

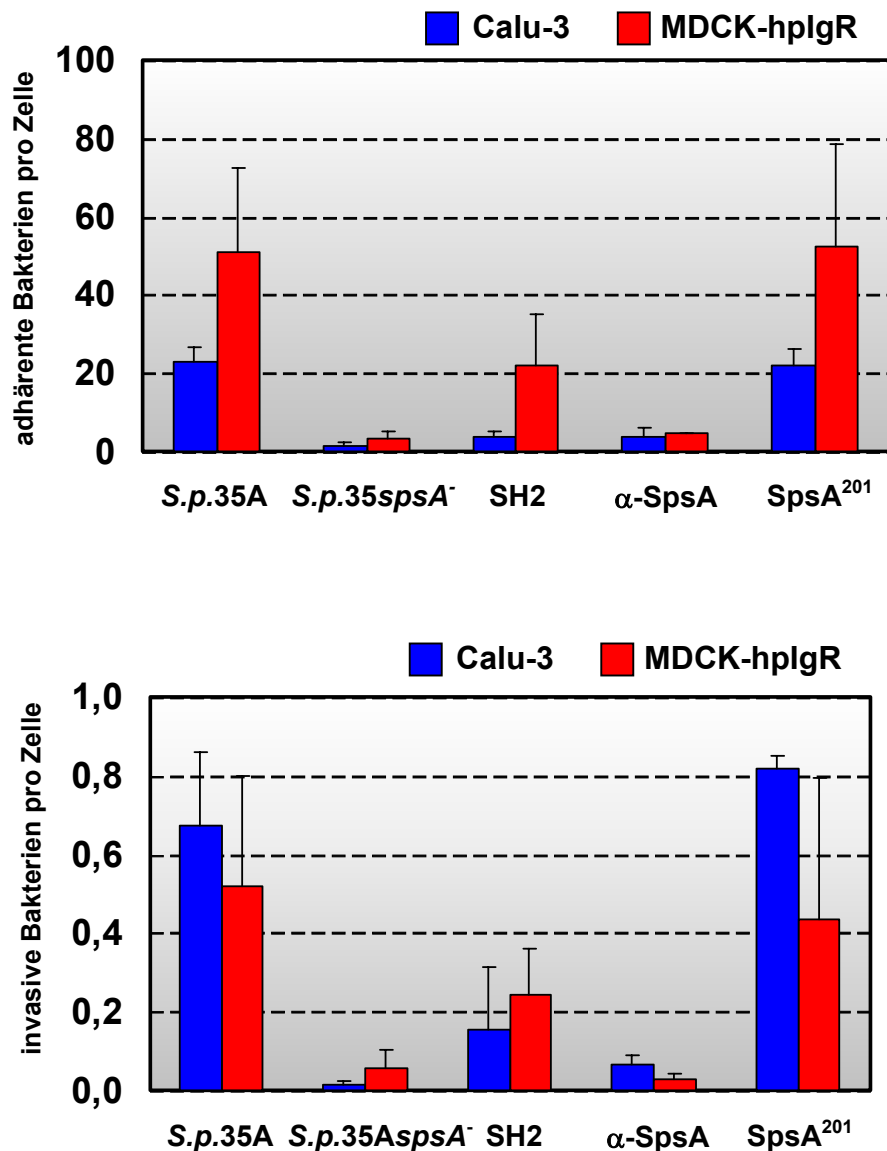
Der *S. pneumoniae* Stamm *S.p.35A* adhärte mit 22 Bakterien pro Zelle an Calu-3 und mit 51 Bakterien pro Zelle an MDCK-hplgR. Die *spsA*-defiziente Mutante zeigte eine um 94 % verringerte Adhärenz an beide Zelllinien. Die mit SpsA SH2 behandelten Bakterien zeigten eine drastische Reduktion der Adhärenz an Calu-3

und MDCK-hpIgR Zellen. Im Vergleich zur Infektion mit *S.p.35A* war die Adhärenz um 85 % bzw. 57 % verringert. Dagegen zeigte die Inkubation mit dem mutierten Protein SpsA<sup>201</sup> keinen Effekt auf die Bindung der Pneumokokken an die Epithelzellen (Abb. 13). Ebenso wie beim parentalen Stamm konnten etwa 22 Bakterien pro Calu-3 Zelle und 52 Bakterien pro MDCK-hpIgR Zelle binden (Tab.4). Die Invasion der *spsA*-Mutante war im Vergleich zum parentalen Stamm deutlich reduziert. Die Inkubation der Pneumokokken mit dem SpsA-Derivat SH2 verringerte die Internalisierung in Calu-3 Zellen um 78 % und in MDCK-hpIgR um 46 %. Bei der Inkubation mit SpsA<sup>201</sup> konnte keine signifikante Veränderung der Invasion festgestellt werden.

| Bakterien                            | Adhärente Bakterien pro Zelle |               | Invasive Bakterien pro Zelle |             |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
|                                      | Calu-3                        | MDCK-hpIgR    | Calu-3                       | MDCK-hpIgR  |
| <i>S.p.35A</i>                       | 22,93 ± 3,67                  | 51,04 ± 21,60 | 0,68 ± 0,19                  | 0,52 ± 0,28 |
| <i>S.p.35A</i> spsA <sup>-</sup>     | 1,52 ± 0,64                   | 3,13 ± 2,04   | 0,02 ± 0,01                  | 0,06 ± 0,05 |
| <i>S.p.35A</i> + SH2                 | 3,61 ± 1,61                   | 22,02 ± 12,95 | 0,15 ± 0,16                  | 0,24 ± 0,12 |
| <i>S.p.35A</i> + $\alpha$ -SpsA      | 3,67 ± 2,29                   | 4,65 ± 0,09   | 0,07 ± 0,02                  | 0,03 ± 0,01 |
| <i>S.p.35A</i> + SpsA <sup>201</sup> | 22,06 ± 4,09                  | 52,29 ± 26,00 | 0,82 ± 0,03                  | 0,43 ± 0,36 |

**Tabelle 4:** Anzahl der adhärenenten und invasiven Bakterien pro Zelle nach der Infektion der hpIgR produzierenden Zelllinien Calu-3 und MDCK-hpIgR mit *S.p.35A* sowie seiner *spsA*-defizienten Mutante. Die Bakterien waren mit SpsA-Derivaten bzw. anti-SpsA-Antiserum behandelt worden.

In einem weiteren Inhibitionsversuch wurde der *Streptococcus pneumoniae* Stamm *S.p.35A* für 15 min bei 37 °C mit 20 % des anti-SH2-IgG Antiserums präinkubiert. Dieser Ansatz mit  $1 \times 10^7$  Bakterien wurde zu  $2 \times 10^5$  Zellen gegeben, so dass die Antikörperkonzentration auf den Zellen während der vierstündigen Infektion 2 % betrug. Da sich die Pneumokokken während der Inkubation auf den Zellen vermehren konnten, wurde der überschüssige Antikörper zusammen mit den Bakterien auf die Zellen gegeben, um neu produziertes freies SpsA zu binden. Die mikroskopische Auswertung der Versuche erfolgte nach der Doppelimmunfluoreszenzfärbung durch Auszählen der adhärenenten und invasiven Bakterien auf mindestens 50 Zellen.



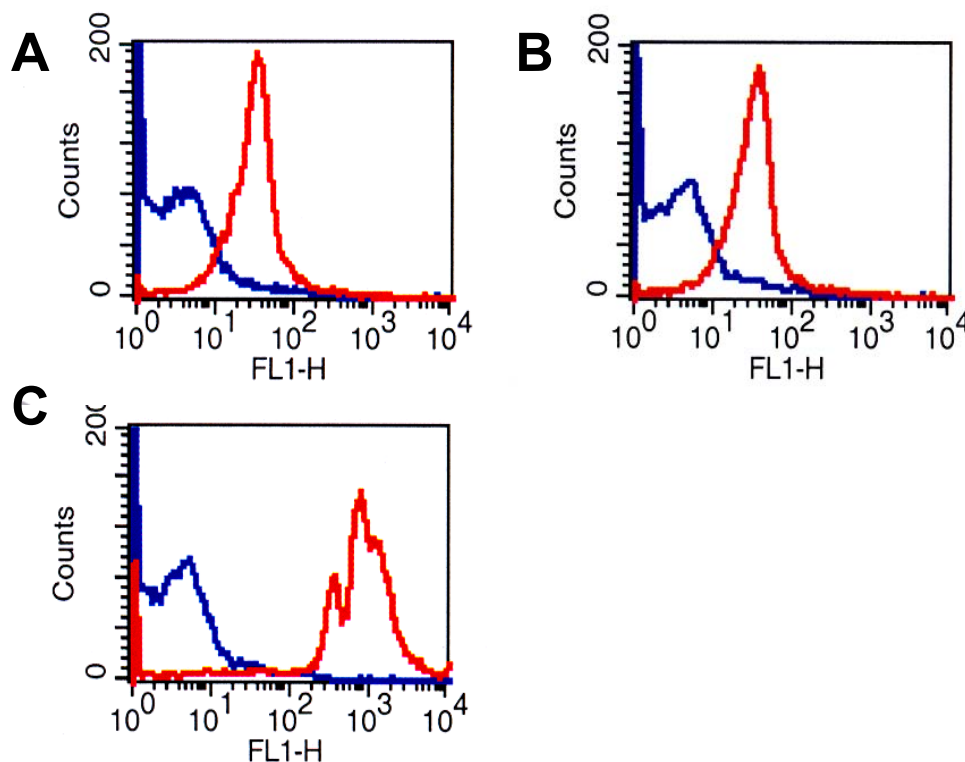
**Abbildung 13:** Adhärenz und Invasion von *Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A an bzw. in die plgR-produzierenden Zelllinien Calu-3 und MDCK-hplgR bei Ko-Kultivierung mit SpsA-Protein oder Antikörpern gegen SpsA. Als Kontrolle wurden die Zellen mit den Stämmen S.p.35A (NCTC 10319) und S.p.35AspsA<sup>-</sup> infiziert. Die Inhibition der Zellen erfolgte mit dem SpsA-Derivat SH2 oder dem mutierten SpsA-Derivat SH2<sup>201</sup>.

Die Inhibition des Pneumokokken Stammes S.p.35A durch Inkubation mit anti-SpsA Antiserum zeigte eine drastische Reduktion der Adhärenz und Invasion an die hplgR produzierenden Epithelzellen. Auf Calu-3 Zellen war die Adhärenz im Vergleich zur Infektion mit dem parentalen Stamm um 84 % reduziert. Die Bindung an MDCK-hplgR Zellen war um 91 % verringert. Die Internalisierung der Bakterien wurde auf Calu-3 von 0,68 auf 0,02 Bakterien pro Zelle reduziert und auf MDCK-hplgR von 0,52 auf 0,06 Bakterien pro Zelle. Diese Werte entsprachen den Zahlen, die für die Adhärenz und Invasion des *spsA*-defizienten Stammes gezählt worden waren.

### 3.1.6 Anheftung von SpsA-beladenen Latexbeads an Epithelzellen

Das cholinbindende Protein SpsA von *Streptococcus pneumoniae* vermittelt die Adhärenz an plgR-produzierende Zellen über das Hexapeptid YRNYPT in SpsA. Die Funktion von SpsA als Adhäsine der Pneumokokken sollte auch direkt nachgewiesen werden. Die SpsA-Derivate SpsA-SH2, SpsA-SH12 und SpsA-SH2<sup>201</sup> wurden auf 3 µm großen Latexpartikeln immobilisiert und die Anheftung an Epithelzellen untersucht.

Die Bindung der Proteine an die Latexbeads wurde in FACS-Analysen überprüft. Die Beads wurden hierfür mit Antikörpern gegen SpsA und einem Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper markiert. Zur Kontrolle wurden die Beads nur mit dem 2. Antikörper inkubiert und die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Um eine Eigenfluoreszenz der Beads auszuschließen, wurden diese ohne gekoppeltes Protein und ohne Antikörperinkubation gemessen.

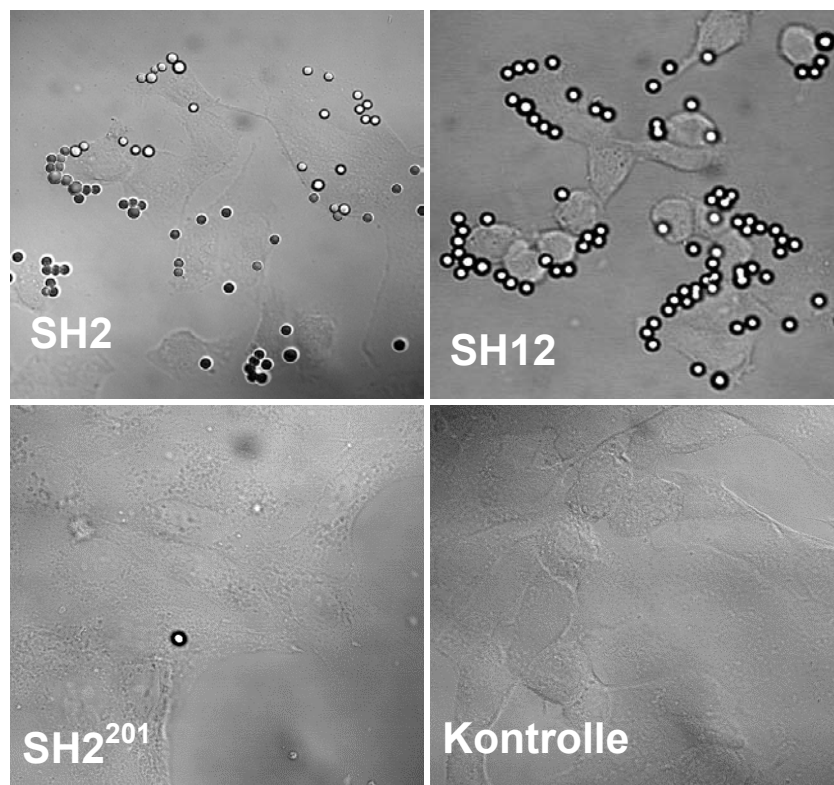


**Abbildung 14:**

Analysen der SpsA beladenen Latexpartikel im FACS. Die blaue Kurve repräsentiert die Messung nach Inkubation der Beads mit dem Fluorochrom-konjugierten Zweitantikörper. In rot ist die Messung der Partikel nach Behandlung mit dem anti-SH2-Antikörper und folgender Inkubation mit dem Fluorochrom-konjugierten Zweitantikörper dargestellt. **A:** SpsA-SH12-gekoppelte Partikel; **B:** SpsA-SH2-gekoppelte Partikel; **C:** SpsA-SH2<sup>201</sup>-gekoppelte Partikel.

In der FACS-Analyse deutet ein schmaler Peak, wie er für die SH12- und SH2-gekoppelten Partikel zu erkennen ist, auf eine Population an Latexbeads hin, die gleich stark mit Protein bedeckt sind und einzeln in Suspension vorliegen. Je weiter der Peak auf der X-Achse nach rechts verschoben ist, desto mehr Protein ist an die Latexpartikel gebunden. Das Auftreten von zwei Peaks in kurzen Abständen hintereinander, deutet auf mehrere Populationen hin, die entweder unterschiedlich stark mit Protein gekoppelt sind, oder Aggregatbildung zeigen. Aggregate werden im FACS als größere Partikel detektiert, die mehr Protein gebunden haben als einzelne Latexbeads.

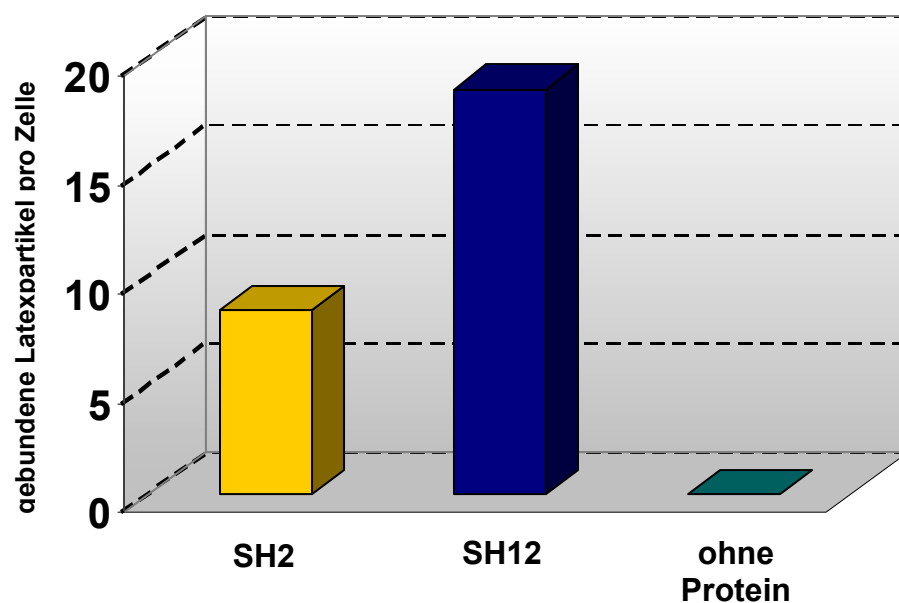
Bei der Kopplung mit SpsA-SH2 oder SpsA-SH12 wurde etwa gleichviel Protein an die Partikel gebunden. SpsA-SH2<sup>201</sup> zeigt eine etwas stärkere Bindung des Proteins an die Beads, wobei hier die Aggregatbildung deutlich zu erkennen ist. Die drei verschieden gekoppelten Latexpartikel konnten für die Inkubationsversuche in der Zellkultur eingesetzt werden.



**Abbildung 15:** Bindung der SpsA-gekoppelten Latexpartikel an MDCK-hplgR. Die SpsA-Derivate SpsA-SH2, SpsA-SH12 und SpsA-SH2<sup>201</sup> wurden an die Latexbeads immobilisiert. Als Kontrolle wurden plgR exprimierende MDCK-Zellen mit Latexpartikeln inkubiert, die nicht mit Protein beladen waren. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

Für die Inkubation von Zellen mit Latexbeads wurden diese, genau wie bei der Infektion mit Pneumokokken, für bis zu 3 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> mit hplgR exprimierenden Zellen inkubiert. Dabei wurden  $1 \times 10^7$  beladene Latexbeads mit  $2 \times 10^5$  Calu-3 oder MDCK-hplgR Zellen infiziert. Als Kontrolle erfolgte die gleiche Behandlung mit MDCK Zellen, die den plgR-Rezeptor nicht produzierten. Eine weitere Kontrolle war der Einsatz von Latexpartikeln, die nicht mit Protein beladen waren.

Die Anheftung der SpsA-Latexbeads ist in Abbildung 16 dargestellt. Die beiden SpsA-Derivate SpsA-SH12 und SpsA-SH2 vermitteln die Adhärenz der Latexbeads an die Zellen. Die mit dem mutierten Protein immobilisierten Latexbeads zeigten keine Bindung an die Zellen. Ebenso wiesen die Latexpartikel ohne Protein keine Anheftung an die Zellen auf.



**Abbildung 16:** Anheftung von SpsA-Latexpartikeln an MDCK-hplgR Zellen. Die Latexbeads waren mit SpsA-SH12 (blau) oder SpsA-SH2 (gelb) immobilisiert. Zur Kontrolle wurden Beads ohne Protein (grün) mit den Zellen inkubiert.

| Zelllinie  | Gebundene Latexbeads pro Zelle |                 |                    |
|------------|--------------------------------|-----------------|--------------------|
|            | SpsA-SH2-Beads                 | SpsA-SH12-Beads | Beads ohne Protein |
| MDCK-hplgR | 8,45                           | 18,59           | 0                  |

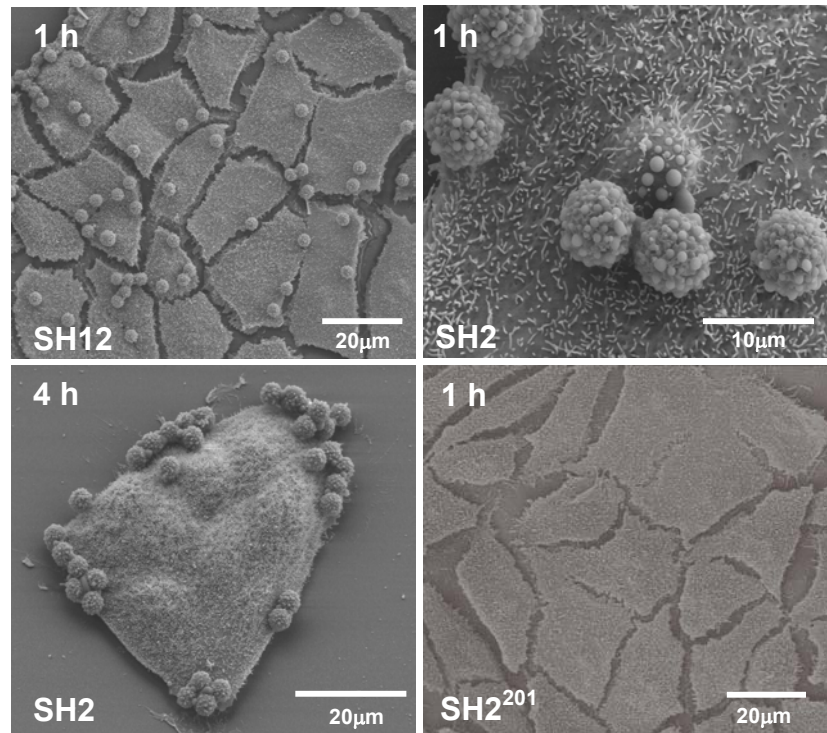
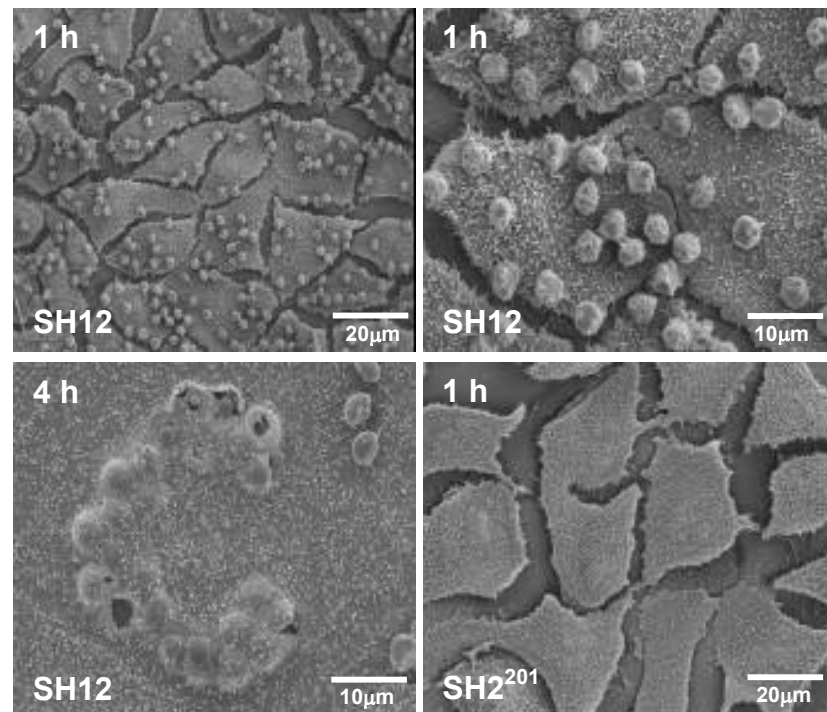
**Tabelle 5:** Anzahl der gebundenen Latexbeads pro MDCK-hplgR Zelle. Die Latexpartikel waren mit SpsA-SH2 oder SpsA-SH12 immobilisiert.



Mit den SpsA-Derivaten SH12 und SH2 beladene Latexbeads binden mit 8 bzw. 18 Partikeln pro Zelle, während Latexbeads, an die kein Protein immobilisiert wurde, nicht spezifisch an die Zellen adhären konnten. Für SpsA-SH2<sup>201</sup> Latexbeads konnte in der Lichtmikroskopie nur eine unspezifische Hintergrund-Bindung an die Zellen gezeigt werden. Als Kontrolle wurden SH12- oder SH2- gekoppelte Latexpartikel mit MDCK- Zellen inkubiert, die den hplgR nicht exprimierten. Aufgrund des fehlenden Rezeptors waren die Beads nicht in der Lage an die Zellen zu binden. Die Inkubation der mukosalen Epithelzellen A549 und HEp-2 mit SpsA-SH12 oder SpsA-SH2 immobilisierten Latexbeads zeigte ebenfalls keine Bindung der Partikel an die Zellen. Die Bindungsversuche mit den Latexbeads deuten darauf hin, dass es sich bei dem Oberflächenprotein SpsA um ein Adhäsion handelt, das direkt an der Adhärenz der Pneumokokken an hplgR produzierende Zellen beteiligt ist.

Die mit SpsA-SH12 und SpsA-SH2 immobilisierten Latexbeads hatten die Funktion des cholinbindenden Proteins als Adhäsion gezeigt. Der Effekt sollte in Elektronenmikroskopische Analysen bestätigt werden. Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen wurden für bis zu 4 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> mit SpsA-SH12, SpsA-SH2 und SpsA-SH2<sup>201</sup> immobilisierten Latexbeads inkubiert. Die Latexbeads wurden in einem Verhältnis von 50 : 1 zu den Zellen gegeben. MDCK Zellen, die den plgR-Rezeptor nicht produzierten, wurden ebenfalls inkubiert. Eine weitere Kontrolle war der Einsatz von Latexpartikeln, die nicht mit Protein beladen waren.

In der Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie (FESEM) konnten die Adhärenz von SpsA-SH12- und SpsA-SH2- gekoppelten Partikeln an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen beobachtet werden. Bereits nach 1 stündiger Inkubation zeigte sich die Bindung der Latexbeads an die Zellen. Latexbeads, die mit SpsA-SH2<sup>201</sup> immobilisiert waren zeigten, ebenso wie Latexbeads ohne Protein, keine Bindung an hplgR produzierende Zellen. Nach 4 stündiger Inkubation konnte die Internalisierung der SpsA-SH12- und SpsA-SH2-Latexbeads in MDCK-hplgR Zellen beobachtet werden. Für Calu-3 Zellen konnte die Aufnahme der Latexbeads in das Zellinnere nicht gezeigt werden. Die SpsA-plgR Interaktion ist demnach mit der Adhärenz und Invasion der Latexbeads assoziiert.

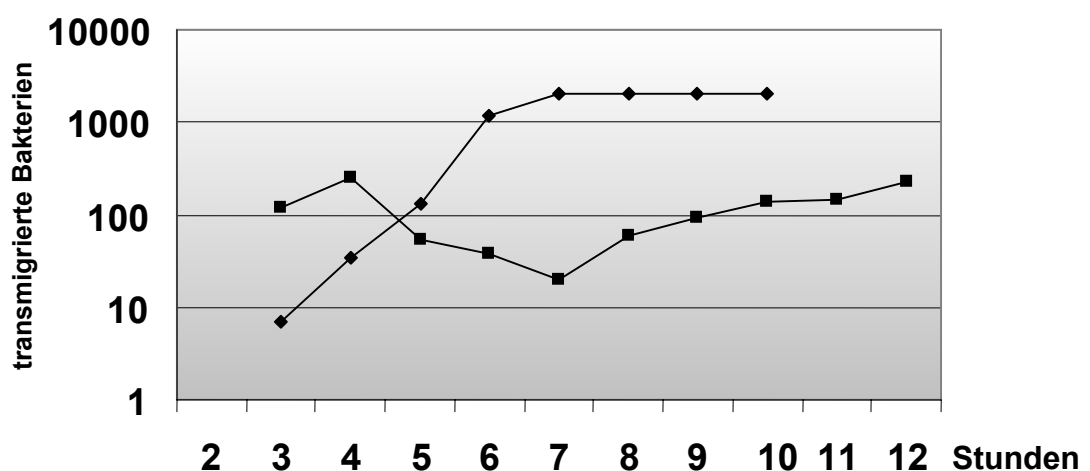
**Calu-3****MDCK-hplgR**

**Abbildung 17:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Anheftung von SpsA-gekoppelten Latexpartikeln an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen. Die Latexpartikel waren mit den SpsA-Derivaten SpsA-SH2, SpsA-SH12 oder dem mutierten Derivat SpsA-SH2<sup>201</sup> gekoppelt.

### 3.1.7 Untersuchung der Transmigration von *Streptococcus pneumoniae* durch polarisierte hplgR produzierende Epithelzellen

*Streptococcus pneumoniae* bindet über das cholinbindende Protein SpsA an den humanen plgR der Epithelzelllinien Calu-3 und MDCK-hplgR. Durch diese Interaktion können Pneumokokken in die Zellen internalisiert werden. Untersuchungen zur Internalisierung der Pneumokokken sowie der Transmigration durch polarisierte Epithelzellen wurden in Zellkulturversuchen im Zwei-Kammer-System durchgeführt. Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen bilden auf den Polycarbonatfiltern von Transwells (Costar Nr. 3415) einen konfluenten Zellrasen, der durch Messung des elektrischen Widerstands zwischen der äußeren und der inneren Kammer kontrolliert werden kann.

Calu-3 Zellen produzieren den humanen plgR an der basolateralen Oberfläche. Die Untersuchung der Interaktion von SpsA mit dem hplgR wurden an der basolateralen Oberfläche der Zellen durchgeführt.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden für 5-7 Tage auf der Unterseite der Polycarbonat-Membran inokuliert. Widerstandsmessungen zeigten für konfluente Calu-3 Zellen einen Wert von durchschnittlich  $160\Omega\text{cm}^2$  und für MDCK-hplgR einen Wert von  $110\Omega\text{cm}^2$ . Die Infektion mit  $5 \times 10^6$  Bakterien des Stamms S.p.35A (NCTC 10319) erfolgte auf der basolateralen Oberfläche für bis zu 12 Stunden. In einer Zeitkinetik wurde stündlich das Medium der unteren Kammer auf Blutagarplatten ausgestrichen und die Anzahl der transmigrierten Bakterien bestimmt.



**Abbildung 18:** Transmigration von *Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A durch polarisierte Calu-3 (◆) und MDCK-hplgR (■) Zellen. Die Infektion erfolgte an der basolateralen Oberfläche. Die Anzahl transmigrierter Pneumokokken wurde stündlich bestimmt.

| Zeit | transmigrierte Bakterien<br>durch Calu-3 Zellen | transmigrierte Bakterien<br>durch MDCK-hplgR Zellen |
|------|---|---|
| 2h   | 0   | 0   |
| 3h   | 7   | 119   |
| 4h   | 34  | 249   |
| 5h   | 134   | 55  |
| 6h   | 1170  | 38  |
| 7h   | 2000  | 20  |
| 8h   | 2000  | 58  |
| 9h   | 2000  | 93  |
| 10h  | 2000  | 135   |
| 11h  | 0   | 148   |
| 12h  | 0   | 224   |

**Tabelle 6:** Anzahl der transmigrierten Bakterien nach der Infektion von polarisierten Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen mit *S.p.35A*. Die Zellen wurden auf der basolateralen Oberfläche infiziert.

*Streptococcus pneumoniae* Stamm *S.p.35A* konnte drei Stunden nach dem Start der Infektion auf der apikalen Seite der Calu-3 Zellen nachgewiesen werden. In der vierten Stunde gelangten 34 Bakterien durch die polarisierten Zellen in die untere Kammer und in der fünften Stunde 134 Bakterien. Nach sechs Stunden stieg die Zahl der transmigrierten Pneumokokken auf über 1000 und ab der siebten Stunde nach dem Start der Infektion gelangten etwa 2000 Bakterien pro Stunde in das untere Well (Abb. 18). Elf Stunden nach dem Infektionsstart konnten keine Bakterien mehr im unteren Well nachgewiesen werden. Die Internalisierung und Transmigration durch MDCK-hplgR Zellen, die von der basolateralen Oberfläche mit *S.p.35A* infiziert worden waren, zeigten ebenfalls nach drei Stunden Infektion den ersten Durchtritt der Bakterien. In der vierten Stunde nach dem Infektionsstart wurde 249 Bakterien in der unteren Kammer nachgewiesen. In den folgenden drei Stunden sank die Zahl der transmigrierten Bakterien. Ab der achten Stunde nach dem Infektionsstart stieg die Zahl auf 58 Bakterien an. In der zwölften Stunde nach dem Infektionsstart wurden 224 Pneumokokken auf der apikalen Zellseite detektiert. *Streptococcus pneumoniae* *S.p.35A* benötige demnach 2 Stunden um einen konfluenten Zellrasen aus polarisierten hplgR produzierenden Zellen zu überwinden.

Die Infektion von Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen auf der apikalen Oberfläche zeigte, dass die Bakterien bei Calu-3 Zellen sechs Stunden und bei MDCK-hplgR Zellen 12 Stunden für die Transmigration benötigten. Die Transmigration von der basolateralen

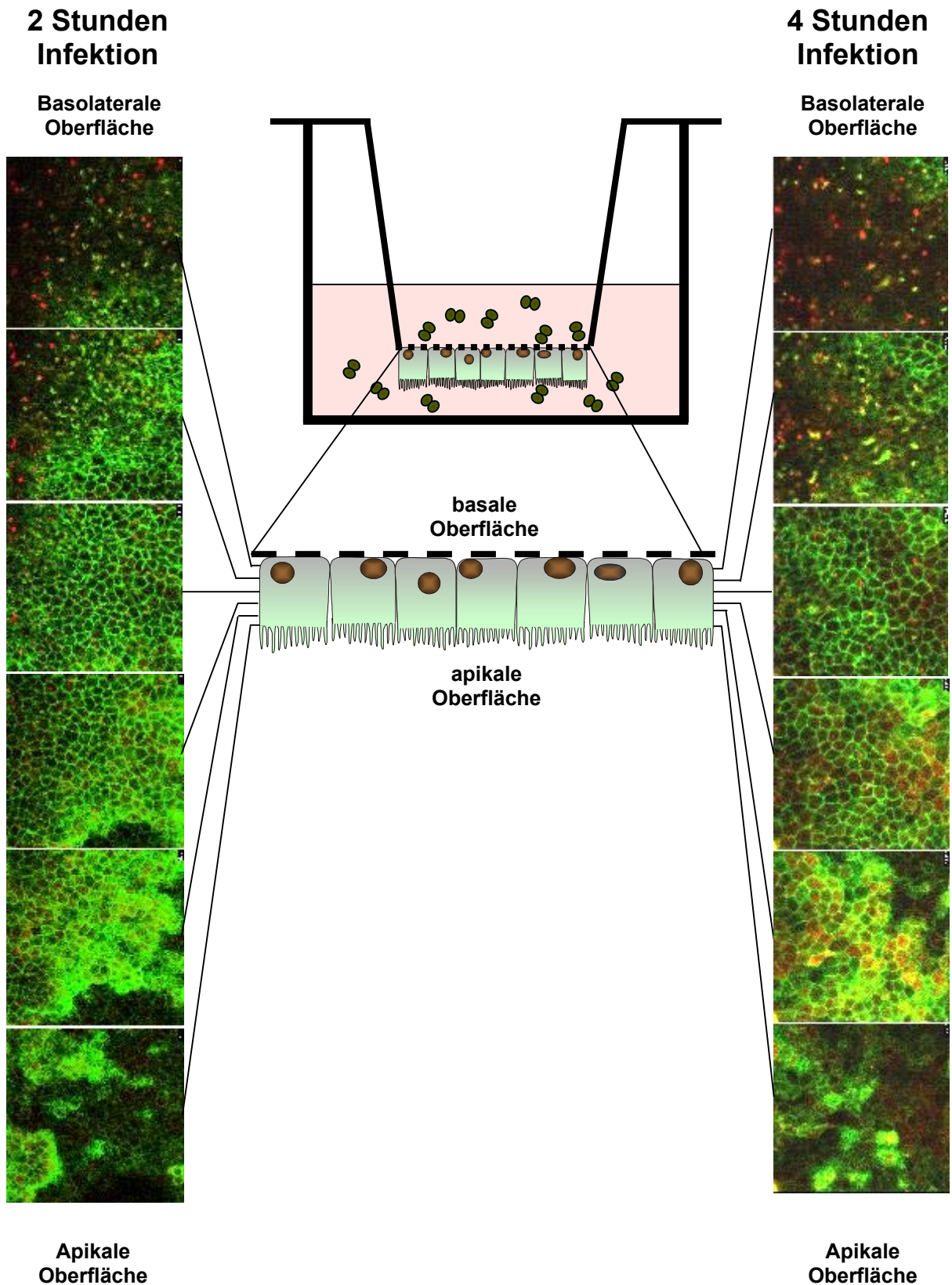
zur apikalen Oberfläche ist effizienter als der Transport in die entgegengesetzte Richtung.

### 3.1.8 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transzytose

Die SpsA-plgR Interaktion vermittelt die Transmigration von *Streptococcus pneumoniae* durch polarisierte plgR produzierende Epithelzellen. Der Transport der Bakterien sollte in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden.

In einer Infektionskinetik im Zwei-Kammer-System wurden Calu-3 Zellen mit  $5 \times 10^6$  Pneumokokken des Stammes S.p.35A auf der basolateralen Oberfläche für bis zu 6 Stunden infiziert. Das Zytoskelett der Zellen wurde durch Färbung mit Alexa 488 (grün) gekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht. Die Pneumokokken wurden mit dem Fluorochrom Alexa 568 rot markiert. Die Auswertung der Infektionsversuche erfolgte an einem Konfokalen Mikroskop der Firma Zeiss. In Schnittbild-Aufnahmen wurden verschiedene Ebenen von der apikalen bis zur basolateralen Oberfläche aufgenommen.

Abbildung 19 zeigt verschiedene Ebenen der infizierten Calu-3 Zellen nach zweistündiger und vierstündiger Infektion. 2 Stunden nach dem Start der Infektion hatten die Pneumokokken die Poren der Membran durchquert und konnten als rote Punkte an der basolateralen Oberfläche des polarisierten Zellrasens nachgewiesen werden. Die Pneumokokken konnten in tiefer liegenden Zellschichten nicht detektiert werden. Nach vierstündiger Infektion wurde *Streptococcus pneumoniae* sowohl an der basolateralen Oberfläche als auch in tieferen Zellschichten nachgewiesen. Damit konnte der Transport von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A durch polarisierte Calu-3 Zellen in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden.



**Abbildung 19:** Transmigration von *Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A durch polarisierte Calu-3 Zellen. Die Bilder zeigen verschiedene Ebenen der polarisierten Zellen, die für 2h bzw. 4h mit Pneumokokken infiziert waren. Die Infektion erfolgte auf der basolateralen Oberfläche. Die Zellen wurden grün und die Bakterien rot markiert.

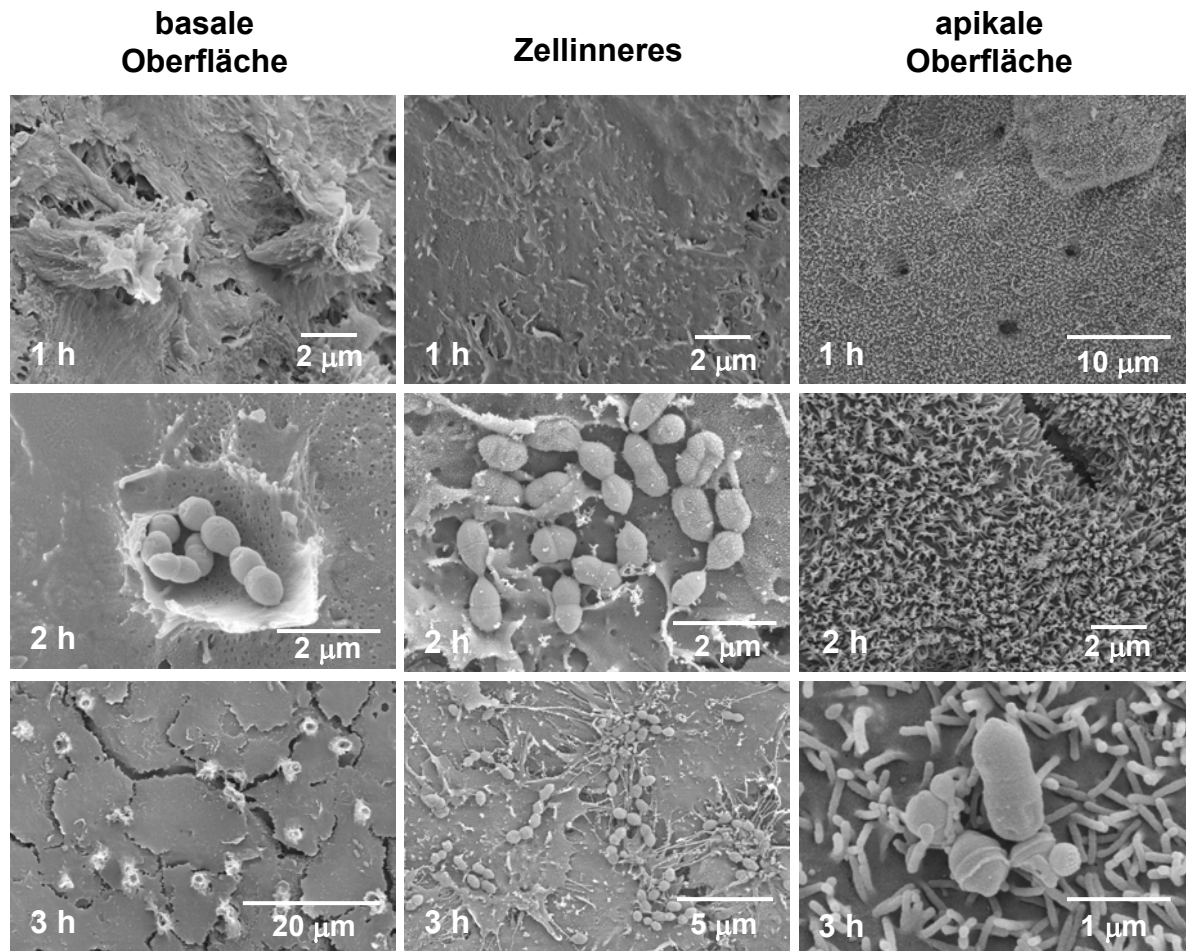
### 3.1.9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Transzytose

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen hatten den Transport von *Streptococcus pneumoniae* durch polarisierte hplgR produzierende Zellen gezeigt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollte untersucht werden, ob die Bakterien für diesen Transport in die Zellen aufgenommen werden, oder ob sie zwischen den Zellen hindurch zur apikalen Oberfläche gelangen.

Infektionskinetiken im Zwei-Kammer-System wurden durchgeführt. Polarisierter Calu-3 Zellen wurden auf ihrer basolateralen Oberfläche mit *Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A für bis zu 5 Stunden infiziert. Für die Elektronenmikroskopie erfolgte die Fixierung der Zellen in Cacopuffer mit 3 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Zelloberfläche zeigten, dass der konfluente Zellrasen nicht über den gesamten Filter komplett geschlossen war (Abb. 20). Gleichmäßig über die Oberfläche verteilt wurden Löcher in der Zellschicht festgestellt, die bis auf die Membran des Transwells reichten. Die Pneumokokken benötigten durchschnittlich eine Stunde um durch die Poren der Transwellmembran auf die basolaterale Zelloberfläche zu gelangen. Nach einstündiger Inkubation wurden noch keine Bakterien auf den Zellen nachgewiesen. Zwei Stunden nach dem Start der Infektion gelangten die Bakterien durch die Poren der Transwellmembran auf die basolaterale Oberfläche der Zellschicht und konnten an die Zellen binden. Pneumokokken wurden vor allem an Ausstülpungen der Zellen auf der basolateralen Oberfläche gefunden. Die Ausstülpungen waren durch das Wachstum der Zellen in die Poren der Transwellmembran entstanden. Dort fand der erste Kontakt der Bakterien mit den Zellen statt. Des Weiteren konnten die Bakterien im Inneren der Zellen nachgewiesen werden. Auf der apikalen Oberfläche konnten keine Pneumokokken gezeigt werden.





**Abbildung 20:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Calu-3 Zellen nach der Infektion mit Pneumokokken Stamm S.p.35A. Die Aufnahmen zeigen verschiedene Ebenen der polarisierten Zellschicht 1h, 2h bzw. 3h Stunden nach dem Start der Infektion. Für jeden Zeitwert ist eine Aufnahme von der basolateralen Oberfläche, eine Aufnahme aus dem Inneren der Zellen und eine Aufnahme von der apikalen Oberfläche abgebildet.

Drei Stunden nach dem Start der Infektion konnten auf der basolateralen Oberfläche nur noch wenige Bakterien nachgewiesen werden. Abbildung 20 zeigt einen Überblick über die basolaterale Seite mit den Zellausstülpungen. Im Zellinneren finden sich nach dreistündiger Inkubation große Ansammlungen von Bakterien. Auf der apikalen Oberfläche können transmigrierte Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 20). Nach vier- bis fünfstündiger Infektion wurde die Zerstörung des konfluenten Zellrasens beobachtet. (ohne Abb.). In den abgestorbenen Zellen konnten Pneumokokken in großer Anzahl nachgewiesen werden.

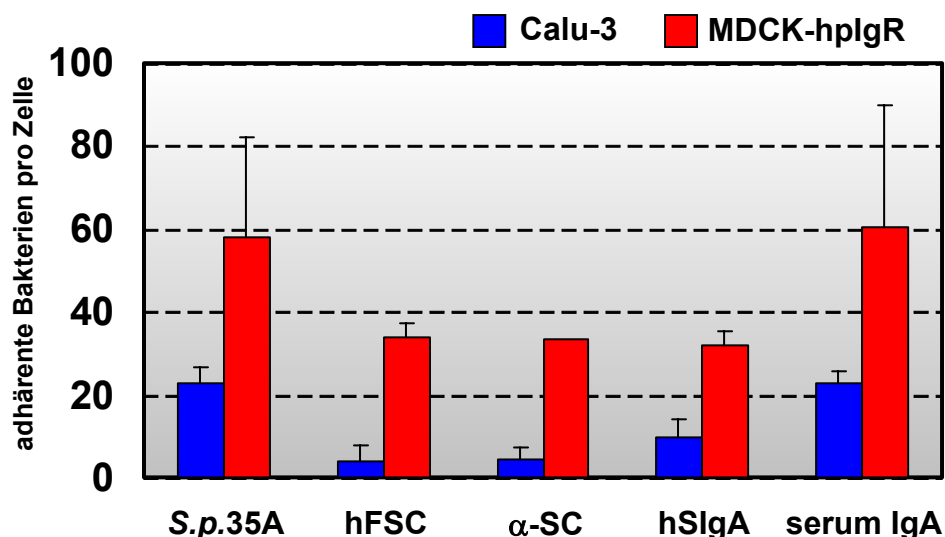
Zusammenfassend kann man feststellen, dass *Streptococcus pneumoniae* polarisierte hplgR produzierende Zellen überwinden kann. Nach der Bindung der



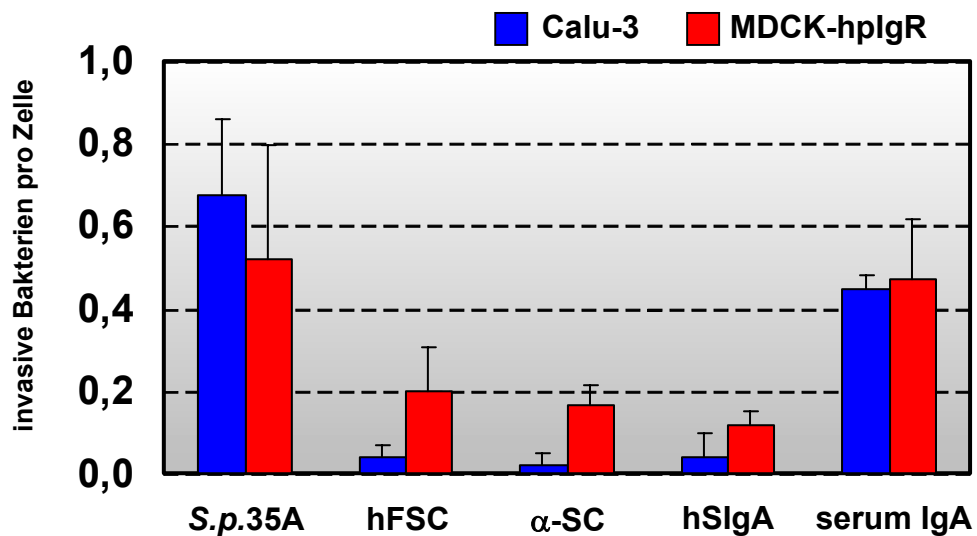
Pneumokokken an die basolaterale Oberfläche der Zellen werden sie internalisiert und durch die Zellen hindurch zur apikalen Oberfläche transportiert.

### 3.1.10 Inhibitionsversuche mit humaner SC und Antikörpern

Die Adhärenz- und Invasionsversuche von *Streptococcus pneumoniae* mit hplgR-exprimierenden Zellen bewiesen die Funktion des bakteriellen Oberflächenproteins SpsA als Adhäsion. SpsA bindet an die sekretorische Komponente des hplgR, die Ectodomäne dieses Transmembranproteins der Epithelzellen. Zur Aufklärung der Rolle des Rezeptors im Invasionsprozess wurden Inhibitionsversuche mit freier sekretorischer Komponente, mit sekretorischem IgA und mit Antikörpern gegen die sekretorische Komponente durchgeführt. Die Pneumokokken wurden auch mit Serum IgA präinkubiert, das nicht an die Pneumokokken bindet (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Die Präinkubation der Bakterien erfolgte mit jeweils 10 µg Protein für 15 min bei 37 °C. Die Zellen wurden mit 20 % des Antikörpers für 20-30 min vor der Infektion mit den Bakterien behandelt. Die Auswertung der Versuche erfolgte wiederum in der Fluoreszenzmikroskopie. Die adhärenenten und invasiven Bakterien wurden auf jeweils 50 Zellen ausgezählt.



**Abbildung 21:** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A (NCTC 10319) nach Präinkubation mit hFSC, anti-SC-Antiserum, humanem SIgA, Serum IgA oder ohne Präinkubation an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen.



**Abbildung 22:** Invasion von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A (NCTC 10319) nach Präinkubation mit hFSC, anti-SC-Antiserum, humanem SIgA, Serum IgA oder ohne Präinkubation in Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen.

| Bakterien           | Adhärente Bakterien pro Zelle |               | Invasive Bakterien pro Zelle |             |
|---------------------|-------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
|                     | Calu-3                        | MDCK-hplgR    | Calu-3                       | MDCK-hplgR  |
| S.p.35A             | 22,93 ± 3,67                  | 58,17 ± 23,91 | 0,68 ± 0,19                  | 0,52 ± 0,28 |
| S.p.35A + hFSC      | 4,55 ± 2,73                   | 30,87 ± 3,70  | 0,04 ± 0,03                  | 0,19 ± 0,11 |
| S.p.35A + α-SC      | 9,81 ± 4,42                   | 31,89 ± 3,19  | 0,02 ± 0,03                  | 0,16 ± 0,05 |
| S.p.35A + hSIgA     | 4,06 ± 3,51                   | 33,74 ± 3,48  | 0,04 ± 0,06                  | 0,12 ± 0,03 |
| S.p.35A + serum IgA | 26,52 ± 8,88                  | 46,73 ± 25,64 | 0,48 ± 0,13                  | 0,65 ± 0,17 |

**Tabelle 7:** Anzahl der adhärenen und invasiven Bakterien pro Zelle nach der Infektion der hplgR produzierenden Zelllinien Calu-3 und MDCK-hplgR mit S.p.35A sowie seiner *spsA*-defizienten Mutante. Die Bakterien waren mit freier sekretorischer Komponente, anti-SC-Antiserum, humanem sekretorischem IgA sowie Serum IgA behandelt worden.

Abbildungen 21 und 22 zeigen die Ergebnisse des Infektionsversuchs mit Stamm S.p.35A auf den beiden Zelllinien Calu-3 und MDCK-hplgR.

Die Adhärenz von S.p.35A ohne Präinkubation betrug auf Calu-3  $22,9 \pm 3,6$  Pneumokokken pro Zelle und auf MDCK-hplgR  $58,1 \pm 23,9$  Bakterien pro Zelle. Die Auszählung der invasiven Bakterien pro Zelle zeigte Werte von 0,7 bzw. 0,5 für die beiden Zelllinien. Durch die Präinkubation mit freier sekretorischer Komponente, dem

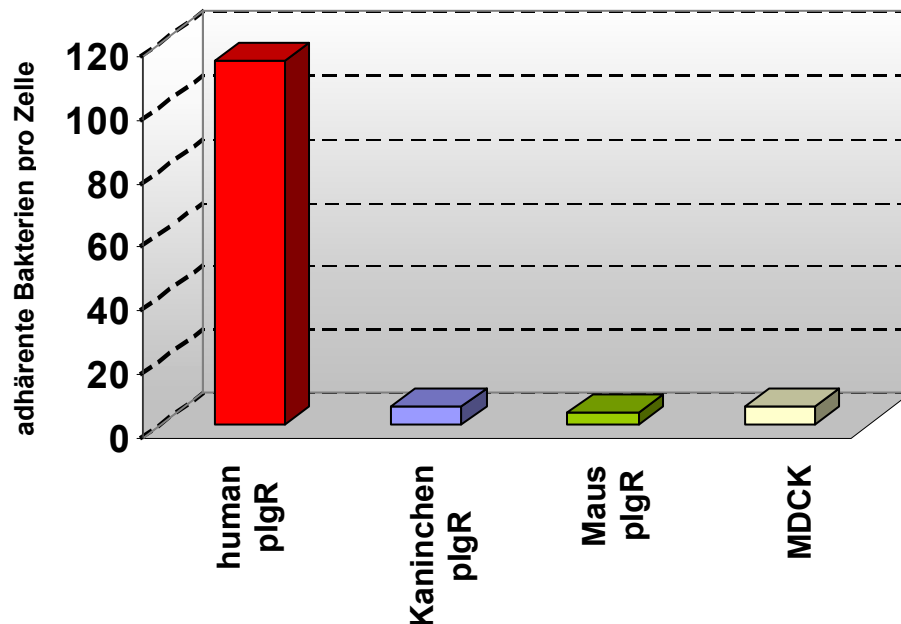
extrazellulären Teil des hplgR, mit Antikörpern gegen die sekretorische Komponente oder mit humanem sekretorischem IgA konnten sowohl Adhärenz als auch Invasion der Pneumokokken an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen um mehr als 50 % reduziert werden (Tabelle 7). Die Präinkubation mit Serum IgA hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf Adhärenz oder Invasion der Pneumokokken. Im Vergleich zum Wildtyp konnten etwa gleich viele Bakterien an die Zellen adhärieren und auch in diese eindringen. Die Adhärenz und Invasion konnte durch die Ectodomänen, die sekretorische Komponente des hplgR, SIgA und anti-SC Antiserum inhibiert werden. Serum IgA, welches von Pneumokokken nicht gebunden wird, hatte keinen Einfluss auf die Infektion.

### 3.1.11 Spezies-spezifische Interaktion von SpsA mit plgR produzierenden Zellen

Bindungsanalysen im Immunblot hatten gezeigt, dass SpsA humanspezifisch an SIgA und SC bindet (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Zur weiteren Untersuchung der Humanspezifität in der Zellkultur wurden Infektionsversuche mit MDCK Zellen durchgeführt, die mit cDNA transfiziert waren, die für den humanen plgR, für den Rezeptor aus der Maus oder aus dem Kaninchen kodieren. Die Zellen wurden mit dem 50-fachen an *Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A für 4 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> infiziert. Als Kontrolle wurden MDCK Zellen infiziert, die keinen der Rezeptoren produzierten. Für die Auswertung wurde die Zahl der adhärenenten Bakterien fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

| Zelllinie           | Adhärenz von S.p.35A pro Zelle |
|---------------------|--------------------------------|
| MDCK-human plgR     | 114,15                         |
| MDCK-Kaninchen plgR | 5,71                           |
| MDCK-Maus plgR      | 3,88                           |
| MDCK                | 5,41                           |

**Tabelle 8:** Anzahl der adhärenenten Bakterien auf hplgR produzierender MDCK-Zellen nach der Infektion mit S.p.35A. Die Zellen produzierten den polymeren Immunglobulin-Rezeptor aus dem Menschen, dem Kaninchen oder der Maus. Als Kontrolle wurden MDCK Zellen infiziert, die keinen plgR-Rezeptor produzierten.



**Abbildung 23:** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A an MDCK Zellen, die mit cDNA, kodierend für den polymeren Immunglobulin-Rezeptor verschiedener Spezies, stabil transfiziert waren. Die Zellen produzierten den humanen plgR, den plgR aus dem Kaninchen oder den murinen plgR. Weiterhin wurden MDCK Zellen infiziert, die keinen der plgR-Rezeptoren produzierten.

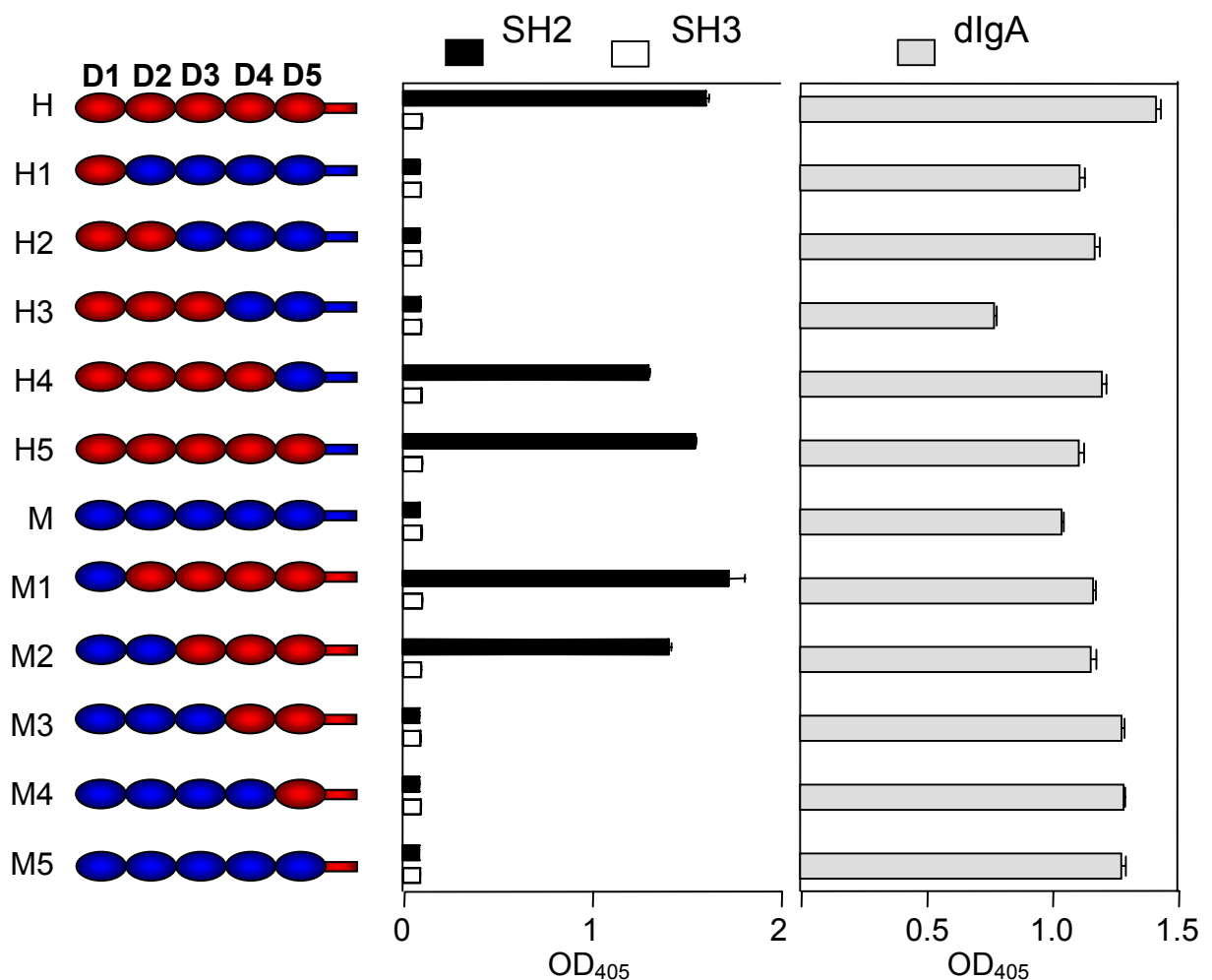
*Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A bindet mit 114 Bakterien pro Zelle an die stabil exprimierenden MDCK-hplgR Zellen. Die Adhärenz an MDCK-Zellen, die den Rezeptor aus der Maus oder dem Kaninchen produzierten, war dagegen auf 5,7 bzw. 3,9 Bakterien pro Zelle reduziert. Die Infektion mit MDCK Zellen, die den plgR-Rezeptor nicht produzierten, zeigte in etwa die gleichen Werte. Auch auf diesen Zellen war die Adhärenz auf etwa fünf Bakterien pro Zelle reduziert.

Diese Ergebnisse waren ein weiterer Nachweis für die Humanspezifität dieser Interaktion. Des Weiteren konnte die Humanspezifität im Inhibitionsversuch gezeigt werden. Neben der Inhibition mit humanem SIgA (Abb. 21) wurden die Bakterien auch mit SIgA präinkubiert, das aus dem Kaninchen isoliert worden war. Die Inkubation mit humanem SIgA zeigte eine deutliche Reduktion der Bindung der Pneumokokken an Calu-3 und MDCK-SC (Abb. 21). Die Inkubation mit sekretorischem IgA aus dem Kaninchen zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Adhärenz oder Invasion der Bakterien an plgR-produzierende Epithelzellen.

## 3.2 Identifizierung des SpsA-Bindungsmotivs im humanen plgR

### 3.2.1 Bindung chimerer Maus-Human-SC-Moleküle an SpsA

Chimeren SC-Moleküle, bestehend aus humanen und Mausdomänen wurden hergestellt, um den Einfluss der einzelnen Domänen des extrazellulären Bereichs des hplgR (Domäne 1-6) an der Bindung an das bakterielle SpsA zu untersuchen. Es wurden Moleküle konstruiert, die aus fünf humanen bzw. Maus-SC-Domänen bestanden. In weiteren Molekülen wurden sukzessive die humanen Domänen gegen Domäne der Maus, angefangen bei D1, ausgetauscht (Abb. 24). Die Bindung der chimeren SC-Moleküle an die SpsA-Derivate SpsA-SH2 und SpsA-SH3 wurde im ELISA untersucht.



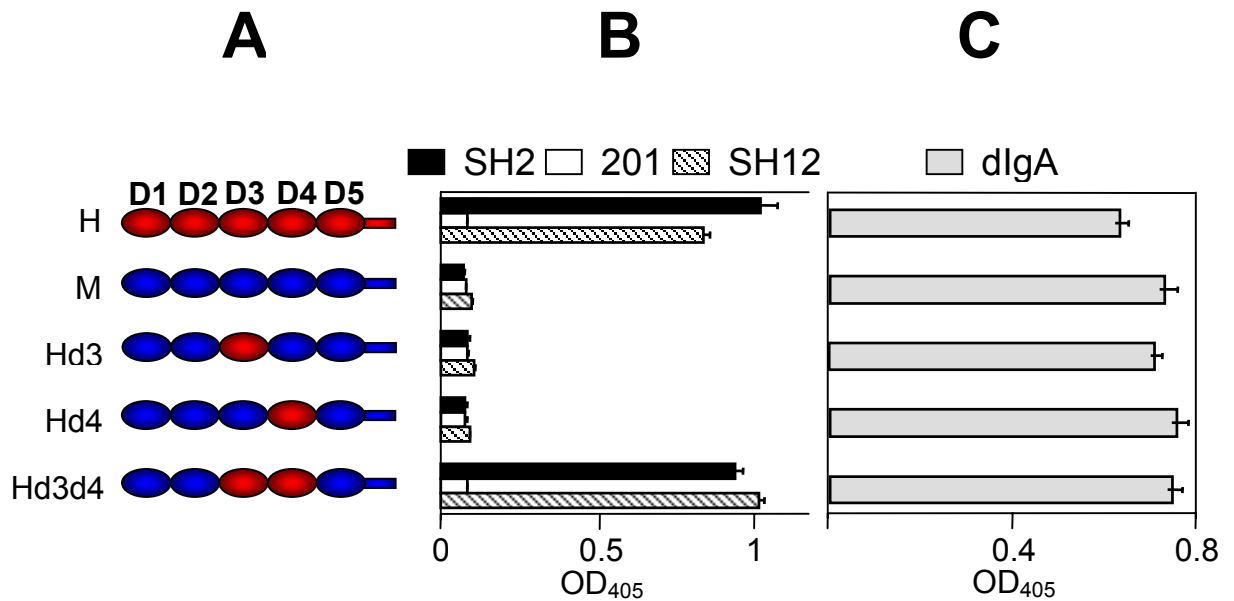
**Abbildung 24:** Bindung der chimeren SC-Moleküle an die SpsA-Derivate SpsA-SH2 und SpsA-SH3. **A:** Chimere SC-Moleküle aus humanen Domänen (rot) und Domänen aus der Maus (blau); **B:** Bindung an SpsA-SH2 (schwarzer Balken) und SpsA-SH3 (weißer Balken); **C:** Bindung der chimeren Moleküle an dlG.

Das SpsA Protein SH3 ist C-terminal verkürzt und besteht aus den Aminosäuren 37-158 des SpsA-Proteins. Das Hexapeptid für die SC/plgR-Bindung ist deletiert. SpsA-SH2 ist der N-terminale Bereich von Aminosäure 37-283 und enthält das SC/plgR Bindungsmotiv. Die Funktion der chimären SC-Moleküle wurde durch die Bindung an dlG untersucht.

Abbildung 24 C zeigt die Fähigkeit aller chimärer Proteine zur Interaktion mit dlG. Eine Bindung an SpsA-SH3 erfolgte bei keinem der untersuchten chimären Proteine. Bindungsversuche zeigten, dass ausschließlich solche SC-Moleküle an das SpsA-SH2 binden konnten, bei denen die Domänen D3 und D4 humanen Ursprungs waren. War dagegen in einem chimären Protein nur eine der beiden Domänen humanen Ursprungs, erfolgte keine Bindung an SpsA-SH2. Der Austausch der Domänen D1, D2, und D5 gegen Maus-Domänen des plgR hatte keinen Einfluss auf die SC-Interaktion mit SpsA.

### **3.2.2 Bindung chimärer SC-Moleküle mit humaner Domäne D3 und D4 an SpsA**

Die Rolle der Domänen D3 und D4 wurden durch die Konstruktion weiterer chimärer SC-Moleküle analysiert. Bei diesen SC-Molekülen waren ausschließlich Domäne D3 und/oder Domäne D4 humanen Ursprungs. Domäne D1, D2 und D5 waren jeweils aus der Maus. Die Funktionsfähigkeit der Moleküle wurde auch bei diesen chimären Proteinen durch die Untersuchung der Bindung an dlG bestimmt (Abb. 25 C). Für alle untersuchten Moleküle war die Bindung an dlG gemessen worden. Die Bindungsaktivität der chimären SC-Moleküle wurde für drei verschiedene SpsA-Derivate bestimmt. Das SpsA-Derivat SpsA-SH12 besitzt zwei Kopien des Hexapeptids, das als Bindungsmotiv für den humanen plgR identifiziert worden war. In SpsA-SH2 ist das Bindungsmotiv nur einmal vorhanden (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Durch einen Aminosäureaustausch an Position 201 weist das SpsA-SH2<sup>201</sup> keine SC/plgR Bindungsaktivität auf.



**Abbildung 25:** Untersuchungen der Bindung der SpsA-Derivate SH2, SH2<sup>201</sup> und SH12 an chimere SC-Moleküle. **A:** Zusammensetzung der Moleküle aus humanen Domänen (rot) und Domänen aus der Maus (blau); **B:** Bindungsergebnisse der chimere Moleküle an SpsA-SH2 (schwarzer Balken), SpsA-SH2<sup>201</sup> (weißer Balken) und SpsA-SH12 (gestreifter Balken); **C:** Bindung der chimere Moleküle an dIgA.

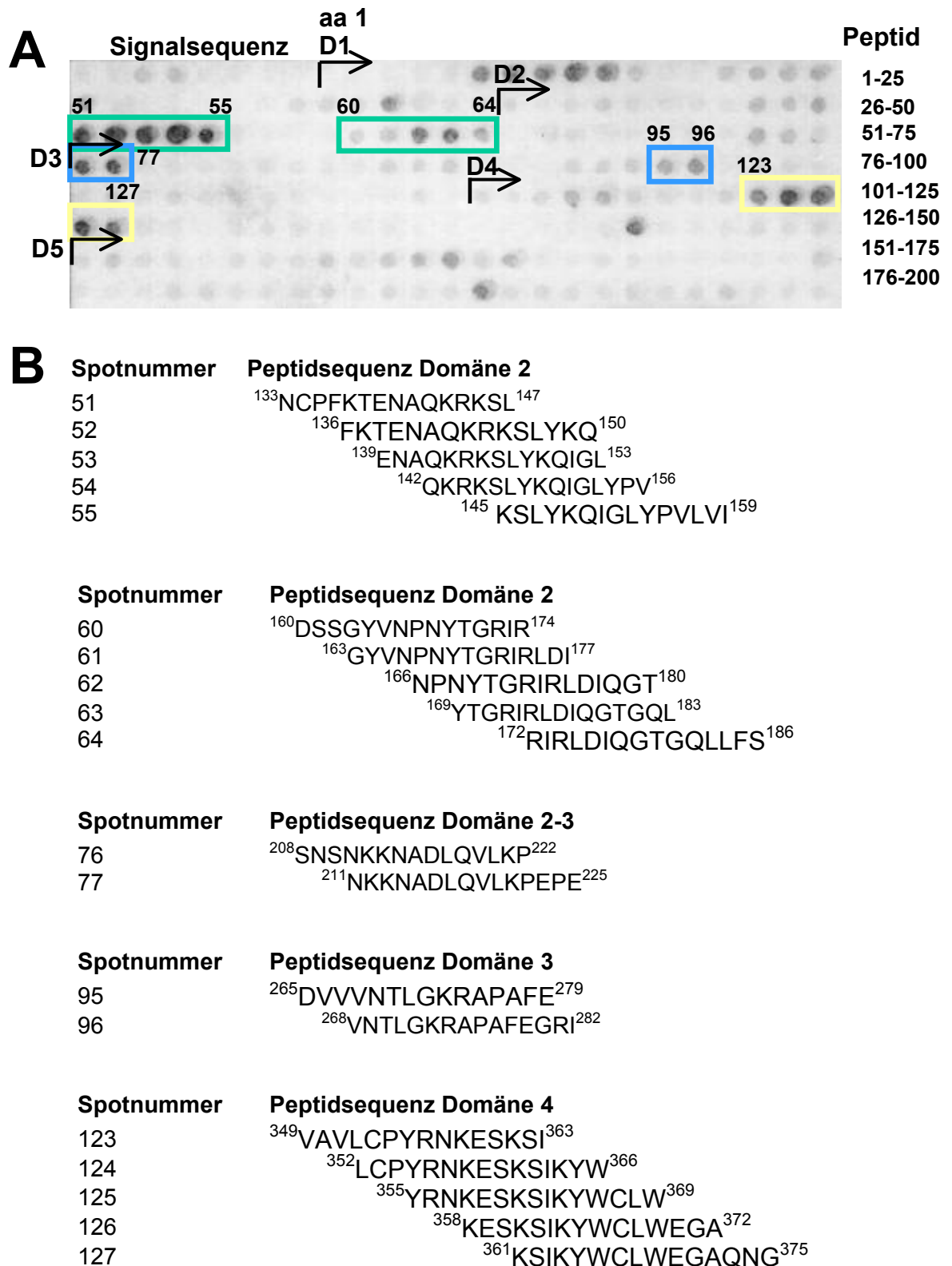
Für keines der chimere Proteine konnte eine Bindung an das mutierte SpsA-SH2<sup>201</sup> nachgewiesen werden. Auch der gesamte humane plgR war nicht in der Lage mit SpsA-SH2<sup>201</sup> zu interagieren. Die Ergebnisse der Bindungsanalysen chimere Proteine mit SpsA-SH2 und SpsA-SH12 zeigten die Interaktion mit der humanen sekretorischen Komponente und mit dem chimere Molekül, bei dem die beiden Domänen D3 und D4 humanen Ursprungs waren. Bestand die sekretorische Komponente dagegen aus den fünf Domänen der Maus, bei denen nur Domäne D3 oder Domäne D4 gegen humane Domänen ausgetauscht waren, zeigten diese Moleküle keine Bindung an SpsA-SH2 oder SpsA-SH12. Die Interaktion mit SpsA-SH2 oder SpsA-SH12 war dann auf ein ähnliches Niveau reduziert, das auch bei SC-Molekülen gemessen wurde, bei denen alle fünf Domänen aus der Maus stammten.

### 3.2.3 Identifizierung minimaler potenzieller SpsA-Bindungsmotive im humanen plgR mittels Spotmembran-Analyse

Zur Identifizierung der minimalen SpsA-Bindungsmotive im humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptor wurde der extrazelluläre Teil des Rezeptors (Aminosäure 1 bis 612) in 200 überlappende synthetische Peptide unterteilt und die jeweils 15 Aminosäuren langen Peptide auf einer Zellulosemembran immobilisiert. Die Peptide waren von Spot zu Spot um jeweils drei Aminosäuren in die C-terminale Richtung verschoben (Offset von 3 Aminosäuren) (Frank, 1992). Die Peptide überlappten daher in 12 Aminosäuren. Im ersten Spot war die Signalsequenz MLLFVLTCLLAVFPA des plgR immobilisiert, gefolgt von den extrazellulären Domänen D1-D5 des hplgR. Durch Inkubation mit dem SpsA-Protein SpsA-SH12 und anschließender Inkubation mit anti-SpsA-IgG Antiserum ( $\alpha$ -SH2) und der Detektion mit Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper, wurden sechs potenzielle Bindungsstellen identifiziert. Die unspezifischen Hintergrundreaktionen der Antikörper wurden zuvor ohne Proteininkubation getestet.

Die Bindungsanalysen zeigte verschiedene Peptide des Rezeptors als mögliche SpsA-Bindungsstellen auf. Fünf Spots in der Domäne D1 des Rezeptors zeigten eine positive Reaktion mit SpsA (Abb. 26). Sie wurden nicht als spezifisches Bindungsmotiv betrachtet, da sie mit der Bindedomäne für das polymere Ig überlappten und somit als Bindungsregion für SpsA nicht in Frage kamen. Weiterhin zeigten die Peptidspots 51-55 und 60-64 in Domäne D2, 76-77 und 95-96 in Domäne D3 sowie die Spots 123-127 in Domäne D4 eine positive Reaktion (Abb. 26). Die Peptide 51-55 und 60-64 repräsentieren die Aminosäuren 133-159 und 160-186, die in Domäne D2 des hplgR lokalisiert sind. Weiterhin wurden die Peptide 76-77, die den Übergang von Domäne D2 zu Domäne D3 in dem Rezeptor repräsentieren, als positive Spots identifiziert. Sie beinhalten die Aminosäuren 208-225 des hplgR. Die beiden Spots 95 und 96 schließen die Aminosäuren 265-282 der Domäne D3 ein. Schließlich wurde eine positive Reaktion für die Spots 123-127 detektiert, die den Aminosäuren 349-375 der Domäne D4 entsprechen (Abb. 26).





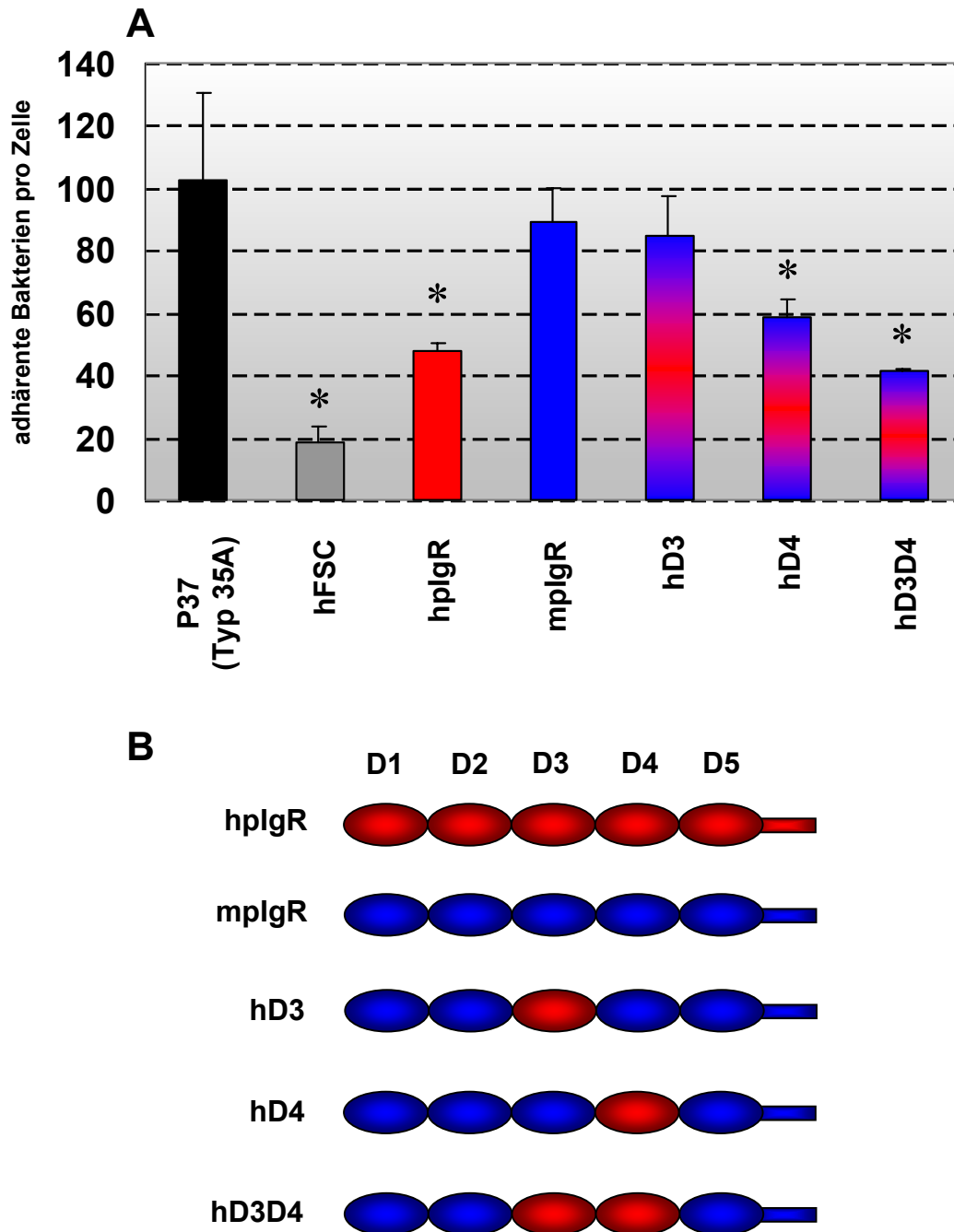
**Abbildung 26:** **A:** Spotmembran Analyse mit 200 synthetischen 15 Aminosäuren langen Peptiden der 5 extrazellulären Domänen des hplgR. Die Membran wurde mit SpsA und anti-SpsA-Antikörpern behandelt. Fünf potenzielle Bindungsdomänen für das bakterielle Oberflächenprotein SpsA wurden detektiert und sind in der Abbildung markiert. **B:** Nummern der positiven Peptide sowie deren Aminosäuresequenz.

Computergestützte Analysen des Hydratisierungsgrades der einzelnen Aminosäuren in der Primärstruktur des Rezeptors ermöglichen eine theoretische Darstellung der mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche des Rezeptors lokalisierten Bereiche (Janin und Wodak, 1978; Garnier *et al.*, 1978; Emini *et al.*, 1985). Die durch die Spotmembran identifizierte Übergangsregion von Domäne D2 zu Domäne D3 sowie die in Domäne D4 lokalisierte mögliche Bindungsregion liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche des Rezeptors. Des Weiteren weist der in Domäne D2 zwischen den Aminosäuren 138 und 144 lokalisierte Bereich eine hohe Hydratisierung auf, die wiederum darauf hindeutet, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche des Rezeptors lokalisiert ist. Die beiden weiteren Bindungsmotive in Domäne D2 zwischen den Aminosäuren 160 und 186 sowie in Domäne D3 zwischen den Aminosäuren 265 und 282, die in der Spot-Membran-Analyse eine Bindung von SpsA zeigten, sind sehr wahrscheinlich nicht Oberflächenlokalisiert. Diese Ergebnisse ergänzten die durch die Spotmembran erhaltenen Ergebnisse und deuteten auf drei mögliche Bindungsmotive für SpsA hin. So könnten die Aminosäuren 138 bis 144 aus Domäne D2, Aminosäuren aus der Übergangsregion von Domäne D2 zu Domäne D3 und die Aminosäuren 349 bis 375 an der Interaktion von SpsA mit dem humanen plgR beteiligt sein.

### 3.2.4 Inhibition der Adhärenz von Pneumokokken mit chimernen SC-Molekülen

Die Bindungsversuche mit chimernen Maus-SC-Moleküle mit bakteriellem SpsA deuteten darauf hin, dass die beiden Domänen D3 und D4 an der Interaktion mit dem Oberflächenprotein SpsA der Pneumokokken beteiligt sind. Um den Einfluss der beiden Domänen an der Bindung zu bestätigen, wurden die chimernen SC-Moleküle in Inhibitionsversuchen in *in vitro* Infektionen eingesetzt. Rekombinante humane sekretorische Komponente (hplgR) wurde getestet, genauso wie rekombinante SC der Maus (mplgR). Als chimere Proteine wurden SC-Moleküle getestet, bei denen nur die Domäne D3 (Hd3), D4 (Hd4) oder D3 und D4 (Hd3d4) humanen Ursprungs und die Domänen D1, D2 und D5 aus der Maus waren. Des Weiteren wurde nativ aufgereinigte humane sekretorische Komponente im Inhibitionsversuch verwendet. Jeweils 8 µg der Proteine wurden mit den Pneumokokken (*S.p.35A*) für 15 Minuten

bei 37 °C präinkubiert.  $1 \times 10^7$  Bakterien wurden mit  $2 \times 10^5$  Calu-3 Zellen für 4 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der adhärenenten Bakterien auf je 50 Zellen.



**Abbildung 27:** **A:** Adhärenz von *S. pneumoniae* an Calu-3 Zellen nach Präinkubation mit chimären SC-Molekülen (**B**). **1:** *S.p.35A* (NCTC 10319); **2:** *S.p.35A* präinkubiert mit hFSC; **3:** *S.p.35A* präinkubiert mit humanem plgR; **4:** *S.p.35A* präinkubiert mit murinem plgR; **5:** *S.p.35A* präinkubiert mit hD3; **6:** *S.p.35A* präinkubiert mit hD4; **7:** *S.p.35A* präinkubiert mit hD3D4.

\* =  $P < 0,05$

| Bakterien                   | Anzahl adhärenter Bakterien<br>pro Calu-3 Zelle |
|-----------------------------|---|
| <i>S.p.35A</i> (NCTC 10319) | 102,3 ± 27,9                                    |
| <i>S.p.35A</i> + hFSC       | 18,2 ± 5,6                                      |
| <i>S.p.35A</i> + hplgR      | 47,6 ± 2,5                                      |
| <i>S.p.35A</i> + mplgR      | 88,9 ± 10,8                                     |
| <i>S.p.35A</i> + hD3        | 84,9 ± 12,3                                     |
| <i>S.p.35A</i> + hD4        | 58,5 ± 5,9                                      |
| <i>S.p.35A</i> + hD3D4      | 41,3 ± 0,6                                      |

**Tabelle 9:** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* Stamm *S.p.35A* (NCTC 10319) an Calu-3 Zellen. Die Bakterien waren mit freier sekretorischer Komponente, humanem plgR, Maus plgR oder den chimären SC-Molekülen hD3, hD4 oder hD3D4 präinkubiert worden.

Im Vergleich zu Calu-3 Zellen, die mit dem Pneumokokken Stamm *S.p.35A* (NCTC 10319), ohne Präinkubation mit Protein infiziert waren, wurde die Adhärenz durch humane freie sekretorische Komponente von 102 auf 18 Bakterien pro Zelle reduziert. Die Inkubation der Bakterien mit dem humanen plgR verringerte die Anzahl adhärenter Pneumokokken um 56 %. Die Bindung von Bakterien, die mit dem plgR aus der Maus inkubiert waren, wurde um 11 % reduziert. Das SC-Molekül Hd3 mit der humanen Domäne D3 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Adhärenz der Bakterien an Calu-3 Zellen. Mit dem chimären Protein Hd4 behandelte Pneumokokken, bei dem ausschließlich die Domäne D4 humanen Ursprungs war, zeigte auf Calu-3 Zellen einen Effekt auf die Bindung der Pneumokokken. Die Adhärenz wurde um 44 % verringert. Pneumokokken, die mit dem chimären SC-Molekül hD3D4 inkubiert waren, zeigten eine um 60 % reduzierte Bindung an Calu-3 Zellen.

In dem Inhibitionsversuch konnte der Einfluss der beiden Domänen D3 und D4 auf die Interaktion mit SpsA nachgewiesen werden. Durch die Präinkubation der Bakterien mit Hd3d4 konnte das Protein an das bakterielle Oberflächenprotein SpsA binden, dieses maskieren und dadurch die Adhärenz der Pneumokokken an Calu-3 Zellen inhibieren.

### 3.2.5 Inhibitionsversuche in der Zellkultur mit synthetischen Peptiden

Die in der Spotmembran identifizierten Peptide, die mögliche Bindungsmotive im Rezeptor repräsentierten, wurden in Inhibitionsversuchen in der *in vitro* Infektion epithelialer Zellen analysiert.

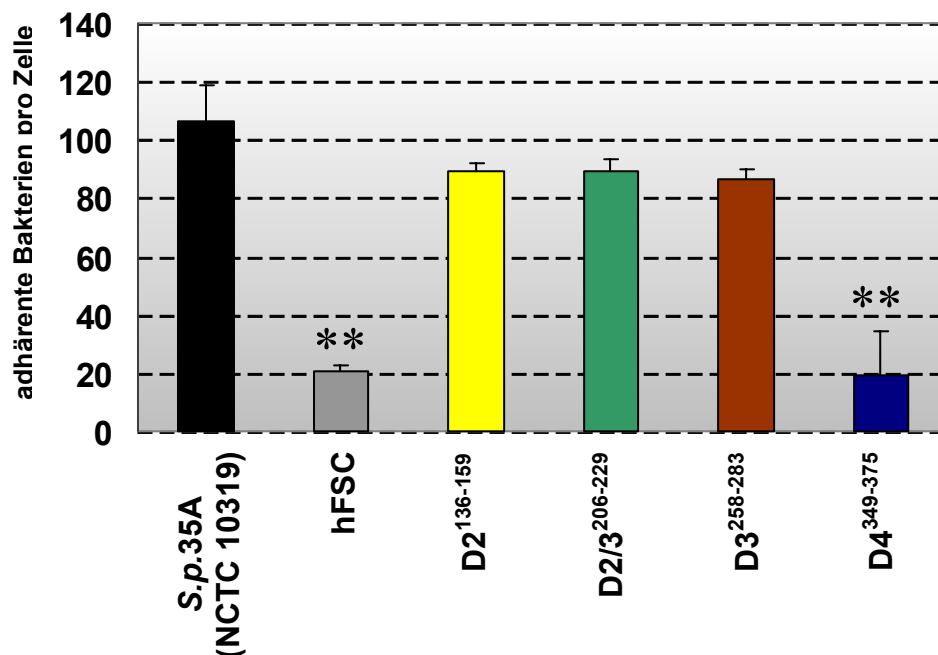
| Peptid                  | Domäne  | Aminosäuren | Sequenz                              |
|-------------------------|---------|-------------|--------------------------------------|
| D2 <sup>136-159</sup>   | 2       | 136-159     | FKTENAQKRKSLYKQIGLYPVLVI             |
| D2/3 <sup>206-229</sup> | 2 und 3 | 206-229     | DDSNSNKKKNADLQV LKPEPELVYE<br>└─▶ D3 |
| D3 <sup>258-283</sup>   | 3       | 258-283     | GENCDVVVNTLGKRAPAFEGRILLNP           |
| D4 <sup>349-375</sup>   | 4       | 349-375     | VAVLCPYNRKESKSIKYWCLWEGAQNG          |

**Tabelle 10:** Sequenz und Aminosäureposition der synthetischen Peptide D2<sup>136-159</sup>, D2/3<sup>206-229</sup>, D3<sup>258-283</sup> und D4<sup>349-375</sup> aus dem humanen plgR.

*Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A wurde mit den Peptide D2<sup>136-159</sup>, D2/3<sup>206-229</sup>, D3<sup>258-283</sup> und D4<sup>349-375</sup> präinkubiert. Des Weiteren wurden die Bakterien mit humaner FSC behandelt. Zur Inhibition der Adhärenz wurden die Pneumokokken mit den Proteinen für 15 min bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Infektion mit  $1 \times 10^7$  Bakterien erfolgte für 4 Stunden in Gegenwart der Proteine.

| Bakterien                         | Anzahl adhärenter Bakterien<br>pro Calu-3 Zelle |
|-----------------------------------|---|
| S.p.35A (NCTC 10319)              | 106,7 ± 12,1                                    |
| S.p.35A + hFSC                    | 20,4 ± 2,4                                      |
| S.p.35A + D2 <sup>136-159</sup>   | 89,1 ± 2,8                                      |
| S.p.35A + D2/3 <sup>206-229</sup> | 89,4 ± 3,9                                      |
| S.p.35A + D3 <sup>258-283</sup>   | 86,6 ± 3,6                                      |
| S.p.35A + D4 <sup>349-375</sup>   | 19,2 ± 15,1                                     |

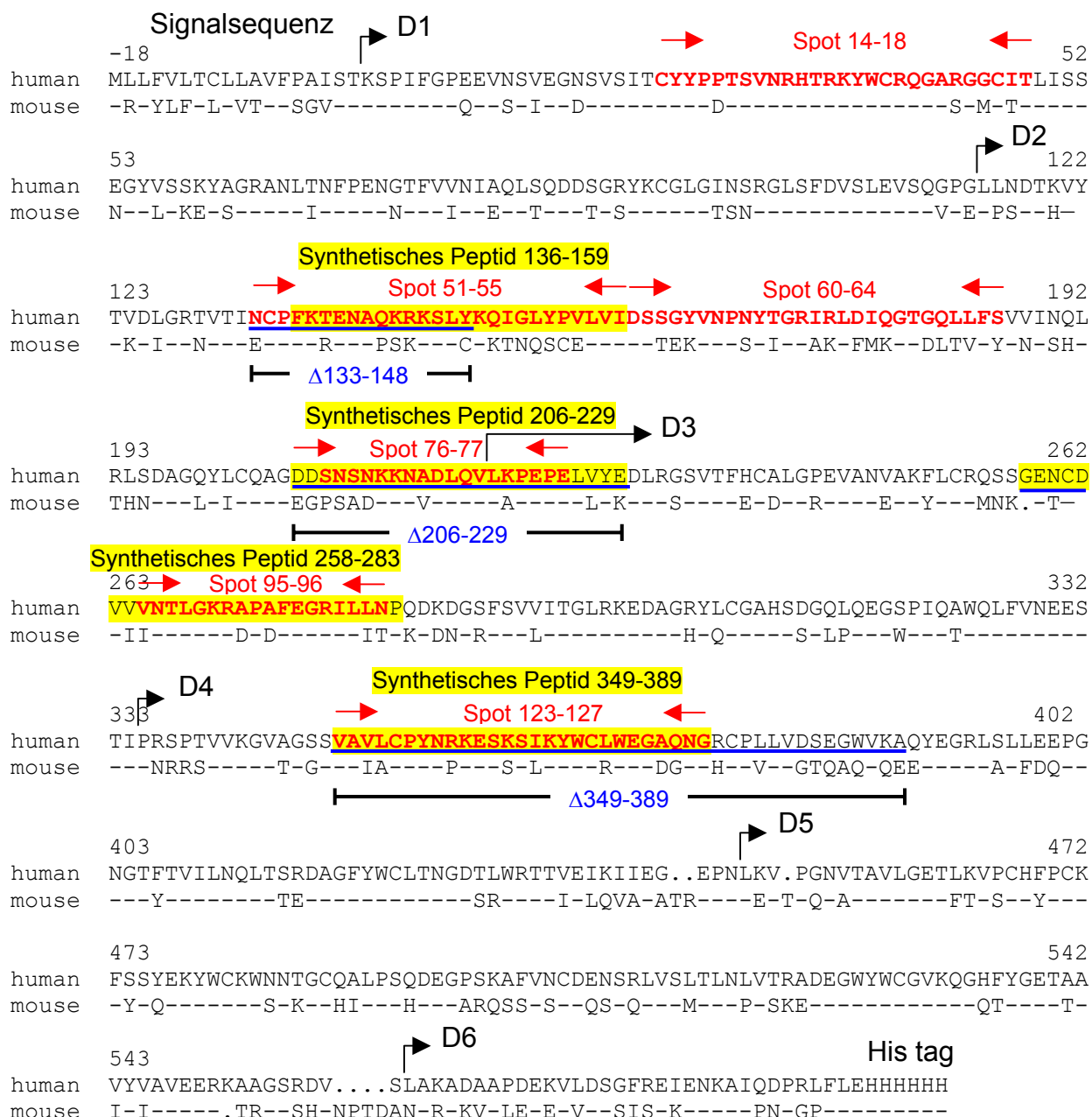
**Tabelle 11:** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* Stamm S.p.35A (NCTC 10319) an Calu-3 Zellen. Die Bakterien waren mit freier sekretorischer Komponente oder mit den synthetischen Peptiden D2<sup>136-159</sup>, D2/3<sup>206-229</sup>, D3<sup>258-283</sup> oder D4<sup>349-375</sup> inkubiert worden.



**Abbildung 28:** Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* S.p.35A (NCTC 10319) an Lungenepithelzellen nach Präinkubation mit synthetischen Peptiden. **1:** S.p.35A; **2:** S.p.35A präinkubiert mit hFSC; **3:** S.p.35A präinkubiert mit D2<sup>136-159</sup>; **4:** S.p.35A präinkubiert mit D2/3<sup>206-229</sup>; **5:** S.p.35A präinkubiert mit D3<sup>258-283</sup>; **6:** S.p.35A präinkubiert mit D4<sup>349-375</sup>. \*\* =  $P < 0,001$

Die Inkubation der Pneumokokken mit 10 µg hFSC führte zu einer um 81 % reduzierten Adhärenz im Vergleich zum Wildtyp. Abbildung 28 zeigt für die mit den drei Peptiden D2<sup>136-159</sup>, D2/3<sup>206-229</sup> und D3<sup>258-283</sup> durchgeführten Infektionen im Vergleich zur Infektion mit Stamm S.p.35A (NCTC 10319) keine signifikante Reduktion der Adhärenz von *Streptococcus pneumoniae* an Calu-3 Zellen. Ausschließlich das Peptid D4<sup>349-375</sup> verursacht eine um 75 % verringerte Adhärenz der Pneumokokken an die hplgR exprimierenden Zellen.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, zeigen die Inhibitionsversuche mit synthetischen Peptiden einen deutlichen Einfluss der Domäne 4 des humanen plgR an der Interaktion mit dem Hexapeptid-Motiv des SpsA von Pneumokokken.



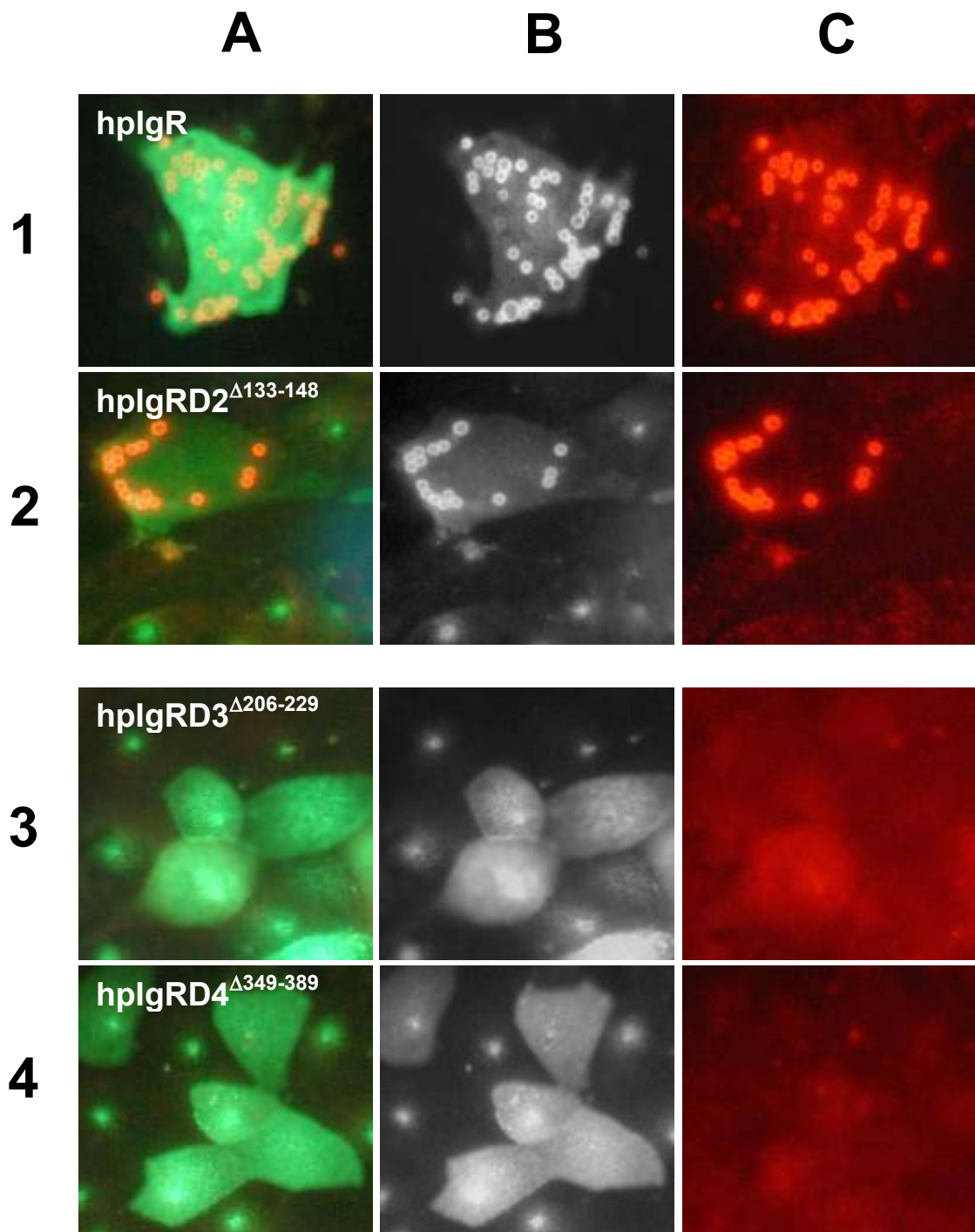
**Abbildung 29:** Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen polymeren Immunglobulin-Rezeptor. In rot sind die sechs Motive markiert, die bei der ersten Spotmembrananalyse positiv auf die Inkubation mit SpsA reagierten. Es wurde eine Region bestehend aus fünf Spots in Domäne 1, zwei Bereiche mit je fünf Spots in Domäne 2, zwei Bereiche mit je zwei Spots in Domäne 3 und eine Region mit fünf Spots in Domäne 4 detektiert. In gelb sind die Bereiche hinterlegt, die als synthetische Peptide im Inhibitionsversuch verwendet worden waren. Die blau unterstrichenen Sequenzen markieren die Bereiche, die bei der Deletionsmutagenese aus der gesamten Sequenz ohne Veränderung des Leserahmens entfernt wurden.

### 3.2.6 Untersuchungen zur SpsA-plgR vermittelten Adhärenz mit mutiertem humanem plgR Rezeptor

Die Inhibitionsversuche mit chimären SC-Molekülen und mit synthetischen Peptiden deuteten auf die Beteiligung der Domänen D3 und D4 an der SpsA-plgR vermittelten Adhärenz von Pneumokokken an plgR produzierende Zellen hin. Die chimären SC-Moleküle zeigten, daß die humanen Domänen D3 und D4 für die Bindung von Pneumokokken an plgR produzierende Zellen nötig sind. Synthetische Peptide zeigten ein potenzielles SpsA-Bindungsmotiv in Domäne D4 des hplgR.

Weitere Untersuchungen zur Beteiligung der in Domäne D3 und D4 des humanen plgR identifizierten SpsA-Bindungsdomänen an der Infektion von Pneumokokken, wurden in Inkubationsversuchen mit Latexbeads auf transient transfizierten MDCK-Zellen durchgeführt. Die Zellen produzierten den humanen plgR, in dem durch Deletionsmutagenese die in der Spotmembran-Analyse identifizierten Peptidsequenzen deletiert waren. Die MDCK-Zellen wurden mit den hplgR-Molekülen hplgRD2<sup>Δ133-148</sup>, hplgRD3<sup>Δ206-229</sup> und hplgRD4<sup>Δ349-389</sup> transient transfiziert. Außerdem wurde der humane plgR in MDCK-Zellen transfiziert. Die Inkubation mit Latexpartikeln, an die SpsA-SH12 immobilisiert wurde, erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Expression des Rezeptors an der Oberfläche der Epithelzellen MDCK. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen mit den SpsA-Latexbeads wurde die Expression der Rezeptoren mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Zur Detektion des Rezeptors wurde dieser mit anti-SC-Antiserum detektiert und mit dem Fluorochrom Alexa 488 markiert, während die Latexbeads mit den beiden Fluorochromen Alexa 488 und 568 angefärbt wurden. Die Auswertung dieses Versuchs erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Als weitere Kontrolle waren stabil transfizierte MDCK-hplgR Zellen und MDCK-Zellen, die keinen der Rezeptoren exprimierten, mit den Latexpartikeln inkubiert worden.





**Abbildung 30:** Adhärenz von SpsA-Latexbeads, an die das SpsA-SH12 immobilisiert wurde, an transient transfizierte MDCK Zellen. Die Zellen wurden mit cDNA, kodierend für den humanen plgR, transfiziert. Die DNA-Sequenz war durch Deletionsmutagenese in den Bereichen der Domänen 2, 3 und 4 verkürzt, die bei der Spot-Membran-Analyse identifiziert worden waren. **1:** Transfektion mit hplgR; **2:** Transfektion mit hplgRD2<sup>Δ133-148</sup>; **3:** Transfektion mit hplgRD3<sup>Δ206-229</sup>; **4:** Transfektion mit hplgRD4<sup>Δ349-389</sup>. Unter **A** sind die Aufnahmen mit einem Fluoreszenz-Doppelfilter abgebildet, der die beiden Wellenlängen für das grüne und das rote Licht hindurchlässt. Bildreihe **B** ist mit dem Fluoreszenzfilter für den grünen Farbstoff Alexa 488 aufgenommen

worden und zeigt die plgR exprimierenden Zellen sowie die Latexpartikel. Reihe C zeigt die Aufnahmen, die mit dem Filter für rotes Licht (Alexa 568) aufgenommen wurden.

Transfizierte MDCK-Zellen leuchten im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen grün. Die SpsA-Latexbeads erscheinen auf den Abbildungen als orange leuchtende Kugeln.

Bei der Inkubation der Latexbeads mit stabil transfizierten MDCK-hplgR Zellen binden die Partikel an alle Zellen. MDCK-Zellen ohne Rezeptor zeigen dagegen keine Interaktion mit den SpsA-Latexpartikeln. Die Deletion der Aminosäuren 133-148 in Domäne D2 des humanen plgR hat im Vergleich zu MDCK-Zellen, die mit dem intakten Rezeptor transfiziert sind, keinen Einfluss auf die Adhärenz von SpsA-Latexbeads. Nach Deletion der potenziellen Bindungsregion binden die Latexbeads mit der gleichen Effizienz an den mutierten Rezeptor, wie an Zellen, die den gesamten Rezeptor exprimieren. Diese Ergebnisse bewiesen, dass eine Deletion im Rezeptor die Oberflächenlokalisierung des Rezeptors nicht beeinflusste. Im Gegensatz zu der Deletion in Domäne D2 hatten die Deletionen in Domäne D3 an Aminosäureposition 206-229 und in Domäne D4 an Position 349-389 einen deutlichen Einfluss auf die Bindung der SpsA-Latexbeads an die transfizierten Zellen. Die Deletionen führten zur Reduktion der Adhärenz von Latexpartikeln an Zellen, die mit hplgRD3<sup>Δ206-229</sup> und hplgRD4<sup>Δ349-389</sup> transfiziert waren.

### **3.2.7 Bindung von SpsA an mutierten humanen plgR mit Peptidpitopen der Maus**

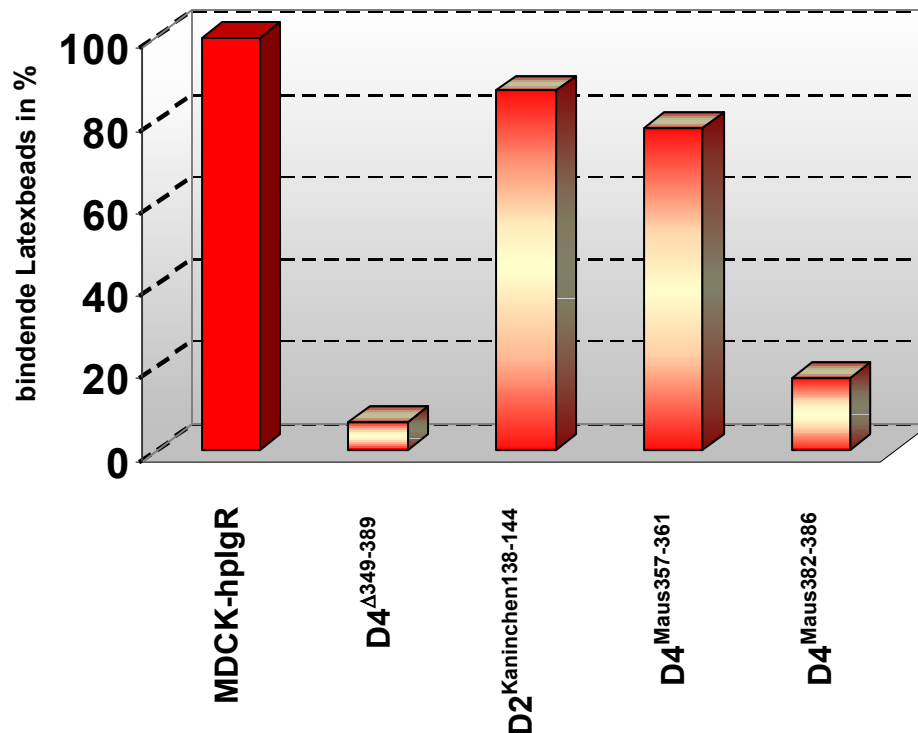
Die Deletion von Peptidsequenzen in den Domänen D2, D3 bzw. D4 des humanen plgR kann Veränderungen in der Sekundär- und damit auch in der Tertiärstruktur des polymeren-Ig-Rezeptors bewirken. Daher wurden weitere Mutanten in den Bereichen der Domänen D2 und D4 des plgR hergestellt, bei denen die Aminosäuren der potenziellen Bindungsmotive gegen Aminosäuren der Maus oder des Kaninchens aus der gleichen Region ausgetauscht wurden. In Domäne D4 wurden die Aminosäuren an den Positionen 357-361 (hplgRD4<sup>Maus357-361</sup>) und 382-386 (hplgRD4<sup>Maus382-386</sup>) gegen die Aminosäuren der gleichen Positionen aus der Maus getauscht. Der Vergleich der Sequenzen des humanen plgR mit der der Maus zeigte für beide Regionen deutliche Sequenzunterschiede (Abb.31). Weiterhin sind die

Aminosäuren mit hoher Wahrscheinlichkeit Oberflächenlokalisiert. Des Weiteren wurden die Aminosäuren an der Position 138-144 in Domäne D2 gegen die Aminosäuren des Kaninchen (hplgRD2<sup>Kaninchen138-144</sup>) ausgetauscht. Spotmembran Analysen hatte das Motiv als potenzielles Bindungsmotiv identifiziert. Computergestützte Analysen des Hydratisierungsgrades zeigten für die Aminosäuren eine hohe Oberflächenwahrscheinlichkeit. Die Deletion der Aminosäuren 138-144, sowie die Inhibition mit synthetischen Peptiden dieser Region hatten keinen Einfluss auf die SpsA-plgR Interaktion gezeigt.

|           |  |
|-----------|--|
| Domäne D4 |  |
| aa 335    |  |
| human     | PRSP TVVKG VAGSS VAVLCPYNRKESKSIKYWCLWEGAQNGRCPLLVDSEGWVKAQY |
| Maus      | -nr rs-----t-g---ia----p---s-l-----r---dg--h--v--gtqaq-qee-  |
|           |  |
|           | aa 445   |
| human     | EGRLSLLEEPGNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVEIKIIEG...EPN    |
| Maus      | ----a-fdq-----y-----te-----sr----i-lqva-atr---               |

**Abbildung 31:** Sequenzvergleich der Domäne D4 der humanen und Maus-SC. Identische Aminosäuren sind in der Maus-Sequenz mit einem Strich (-) markiert. Die beiden Motive, die in der humanen Sequenz durch die Aminosäuren aus der Maus ausgetauscht wurden, sind blau hinterlegt.

Die mutierten Plasmide wurden erneut in MDCK-Zellen transfiziert und die transient transfizierten Zellen nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> mit SpsA-SH12 Latexbeads inkubiert. Das Plasmid mit der Deletion in Domäne D4 (hplgRD4<sup>del349-389</sup>) sowie das Plasmid mit dem hplgR wurden ebenfalls transfiziert. Die Inkubation der Latexpartikel wurde des Weiteren auf MDCK-Zellen durchgeführt, die den Rezeptor nicht produzierten. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch durch Auszählen der adhärenen Partikel auf 100 Zellen.



**Abbildung 32:** Adhärenz von SpsA-Latexpartikeln an transient transfizierte MDCK Zellen. Die Zellen waren mit cDNA, codierend für den humanen plgR, transfiziert. Die Graphik zeigt die Adhärenz von SH12-gekoppelten Latexpartikeln an **1:** MDCK transfiziert mit hplgR; **2:** MDCK transfiziert mit hplgRD4<sup>del349-389</sup>, **3:** MDCK transfiziert mit hplgRD2<sup>Kaninchen138-144</sup>, **4:** MDCK transfiziert mit hplgRD4<sup>Maus357-361</sup>, **5:** MDCK transfiziert mit hplgRD4<sup>Maus382-386</sup>.

Die Ergebnisse der Inkubation von SpsA-Latexbeads mit hplgR produzierenden Zellen sind prozentual dargestellt. Die Adhärenz an Zellen, die den plgR produzieren, wurde als 100 % definiert. Im Vergleich zu der Bindung an den humanen Rezeptor war die Adhärenz an den Rezeptor mit der Deletion in Domäne D4 (AS 349-389) um mehr als 90 % reduziert (Abb. 32). Dieses Ergebnis konnte in der Immunfluoreszenz durch Auszählen der gebundenen SpsA-Latexbeads gezeigt werden. Der Austausch der humanen Aminosäuren 357-361 des Rezeptors gegen die Aminosäuren der Maus konnte die Adhärenz der SpsA-Latexbeads um 22 % reduzieren. Durch den Austausch der Aminosäuren 382-386 in Domäne D4 wurde die Adhärenz der Partikel stärker beeinflusst. Die Bindung war im Vergleich zum Wildtyp auf 17 % reduziert. Für den Aminosäure-Austausch an Position 138-144 in Domäne D2 konnte im Vergleich zum Wildtyp kein signifikant verändertes Bindungsverhalten von SpsA-gekoppelten Latexpartikeln nachgewiesen werden.

## Diskussion

*Streptococcus pneumoniae* ist ein bedeutender humanpathogener Erreger, der Erkrankungen wie Mittelohrentzündung, Pneumonie oder Meningitis auslösen kann (Alonso DeVelasco *et al.*, 1995). Die Kolonisierung des oberen Respirationstrakts und die spezifische Anheftung der Bakterien an Rezeptormoleküle auf der Oberfläche mukosaler eukaryotischer Zellen spielen im Laufe des Infektionsprozesses eine entscheidende Rolle. Die Aufklärung der Mechanismen der Adhärenz und Invasion von Pneumokokken an respiratorische Epithelien stellt einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Infektionsprozesses dar und wird neue Zielmoleküle für die Impfstoffforschung und Therapie aufzeigen.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion des cholinbindenden Proteins SpsA von *S. pneumoniae* mit dem humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptor (hplgR) untersucht. Für Streptokokken und Staphylokokken konnte die Bindung an adhäsive Glykoproteine wie Fibronectin, Fibrinogen, Immunglobulin G, Thrombospondin, Transferrin oder der Serumproteine wie IgA nachgewiesen werden. Diese sogenannten „Brückenmoleküle“ vermitteln die Anheftung und Internalisierung der Bakterien (Chhatwal *et al.*, 1985; Jerlström *et al.*, 1991; Talay *et al.*, 1992; Cleary und Retnoningrum, 1994). Die Untersuchung der Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit diesen Proteinen bewies eine spezifische Interaktion der Pneumokokken mit sekretorischem IgA (SIgA). Die Bindung von Serum IgA konnte nicht nachgewiesen werden. Fibronectin wurde von den Bakterien in seiner immobilisierte Form gebunden (van der Flier *et al.*, 1995). Lösliches Fibronectin zeigte dagegen keine Interaktion mit Pneumokokken (Hammerschmidt *et al.*, 1997). SIgA ist das wichtigste Immunglobulin in humanen Sekreten (Heremans, 1974) und wirkt als wichtiger adaptiver Faktor für die Immunabwehr in der Schleimhaut (Underdown und Schiff, 1986). IgA wird von Plasmazellen in der Lamina Propria der Schleimhäute synthetisiert. Im Serum kommt es hauptsächlich als Dimer vor, das aus zwei durch eine sogenannte J-Kette verbundenen Monomeren besteht und mit der sekretorischen Komponente (SC) verbunden ist. Bei der sekretorischen Komponente handelt es sich um den extrazellulären Teil des plgR, einem Transmembranrezeptor, der IgA über respiratorische und intestinale Schleimhautbarrieren in das Lumen transportiert (Solari und Kraehenbuhl, 1984). Dimeres IgA und pentameres IgM wird für den Transport kovalent an den plgR gebunden. Der Komplex wird mittels

Transzytose durch die Epithelzellen transportiert und SIgA durch proteolytische Spaltung in die mukosalen Sekrete entlassen (Kilian *et al.*, 1988; Kobayashi, 1971). Der Rezeptor wird ebenso unbeladen auf die apikale Seite transportiert und freie sekretorische Komponente (FSC), die nicht an dimeres IgA gebunden ist, kann abgespalten werden (Fallgreen-Gebauer *et al.*, 1993). SIgA wirkt als immunologische Barriere, die die Adhärenz und Invasion von Mikroorganismen an Epithelzellen verhindert. Des Weiteren kann polymeres IgA Viren und Bakterien während der plgR-vermittelten Transmigration neutralisieren. Große Immunkomplexe und Mikroorganismen, die mit polymerem IgA gekoppelt sind, können vom plgR aus den mukosalen Zellen heraustransportiert werden. Dies verhindert die Anlagerung und Invasion der Pathogene in die Schleimhaut (Outlaw und Dimmock, 1990; Enriquez und Riggs, 1998).

Als bakterielles Adhäsion für die sekretorische Komponente und das sekretorische Immunglobulin A konnte für *Streptococcus pneumoniae* das SpsA identifiziert werden (Hammerschmidt *et al.*, 1997). In verschiedenen Serotypen der Pneumokokken treten Variationen des SpsA auf, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Die Expression von SpsA und die Bindung an die SC wurde in mindestens 73 % der getesteten Pneumokokken Isolate nachgewiesen (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Das cholinbindende Protein besitzt einen ungeladenen C-terminalen Bereich, der aus jeweils 20 Aminosäuren langen repetitiven Sequenzen besteht. Diese cholinbindenden Repeats sind für die nicht kovalente Bindung der Proteine auf der gram-positiven Zellwand nötig (Yother und Briles, 1992). Des Weiteren ist eine prolinreiche Sequenz vor den Repeats vorhanden. SpsA-Moleküle werden in zwei so genannte „Clades“ unterteilt. Clade A und Clade B sind unterschiedliche Varianten des Proteins. Clade A besitzt eine hochkonservierte repetitive Sequenz im N-terminalen Bereich des Proteins (Brooks-Walter *et al.*, 1999).

Als minimale SC/SIgA-bindende Domäne konnte ein Hexapeptid im SpsA der Pneumokokken identifiziert werden. Das Motiv ist im N-terminalen Bereich des cholinbindenden Proteins lokalisiert und stellt eine hoch konservierte Region des Proteins dar. Die drei Aminosäuren Tyrosin, Prolin und Threonin an den Positionen 201-203 sind essentiell für die Bindung (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Das Hexapeptidmotiv Y(<sup>H</sup>/<sub>R</sub>)NYPT kommt in allen Pneumokokken Serotypen, außer Serotyp 3, in der repetitiven Sequenz vor (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Iannelli *et al.*, 2002).

In der Surface Plasmon Resonance (SPR) wurde die Bindung von SpsA an die sekretorische Komponente (SC), sowie an sekretorisches IgA analysiert. Die SpsA-Derivate SpsA-SH2, SpsA-SH12, SpsA-SH2<sup>201</sup> sowie das N-terminal verkürzte SpsA-SM1 wurden auf Sensorchips immobilisiert und auf die Bindung von FSC und SIgA untersucht. Die Interaktion zwischen nativem SpsA, SpsA-SH2, SpsA-SH12 und SpsA-SM1 mit hFSC bzw. SIgA war konzentrationsabhängig. Die Echtzeitanalyse zeigte keine Interaktion mit dem mutierten SpsA-SH2<sup>201</sup>. Die Dissoziationskonstanten für die Interaktion von hFSC mit dem nativen SpsA und den rekombinanten SpsA-Derivaten lagen im nanomolaren Bereich, so wie es bereits die Scatchard Analyse gezeigt hatte (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Elm *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde zunächst die Funktion des cholinbindenden Proteins SpsA als mögliches Adhäsion bzw. Invasin in *in vitro* Infektionsversuchen mit mukosalen Epithelzellen analysiert. Die Infektion mit einem Typ 35A Pneumokokkenstamm sowie der entsprechenden *spsA*-defizienten Mutante zeigte, dass Adhärenz und Invasion der *spsA*-Mutante auf den alveolären Zelllinien A549 und Larynxkarzinomzellen HEp-2 nicht beeinflusst war. Die Auszählung der Bakterien sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten keine Unterschiede in der Adhärenz und Invasion der *spsA*-Mutante im Vergleich zum parental Stamm. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Adhärenz der *spsA*-defizienten Mutante an die Lungenepithelzellen Calu-3 sowie die MDCK-hpIgR Zelllinie, die stabil mit cDNA transfiziert ist, die für den humanen polymere Immunglobulin-Rezeptor kodiert, deutlich erniedrigt war. Die Internalisierung der *spsA*-Mutante war ebenfalls signifikant verringert. Im Vergleich zu den hpIgR exprimierenden MDCK Zellen konnten auf MDCK Zellen, die den Rezeptor nicht produzieren, nach der Infektion mit dem Wildtyp Pneumokokkenstamm nur eine geringe Anzahl adhärenter und invasiver Bakterien nachgewiesen werden. An der Interaktion von *S. pneumoniae* mit hpIgR produzierenden Epithelzellen ist der humane polymere Immunglobulin Rezeptor beteiligt. Für die Bindung der Pneumokokken an die beiden Zelllinien HEp-2 und A549 werden dagegen andere Faktoren benötigt, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Ausschließlich Calu-3 und MDCK-hpIgR Zellen zeigten eine SpsA-vermittelte Interaktion mit humanen Epithelzellen. Verschiedene Zelllinien des Respirationstrakts und der Blut-Hirn-Schranke wurden auf die Expression von humanem plgR untersucht. Die Expression des plgR konnte

sowohl für die stabil transfizierten MDCK-hplgR Zellen als auch für Calu-3 Zellen im Immunblot und im Northern-blot nachgewiesen werden. A549, HEp-2 und MDCK Zellen zeigten keine Expression des Rezeptors. Bei den im Immunblot untersuchten humanen Hirn-Endothelzellen (HBMEC), einer Modell-Zelllinie für die Blut-Hirn-Schranke, konnte der hplgR ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Die Adhärenz und Invasion der hplgR produzierenden Calu-3 Lungenepithelzellen von *Streptococcus pneumoniae* ist assoziiert mit der SpsA-plgR Interaktion. Der Mechanismus, über den Pneumokokken an A549 und HEp-2 Zellen binden, ist bisher noch unbekannt.

Für den *S. pneumoniae* Serotyp 35A wurde in *in vitro* Infektionsversuchen mit plgR produzierenden mukosalen Epithelzellen eine SpsA-vermittelte Adhärenz und Invasion gezeigt. Der Einfluss des Serotyps auf die SpsA-vermittelte Infektion wurde in der Zellkultur mit MDCK-hplgR Zellen und Pneumokokken unterschiedlichen Serotyps analysiert. Die verwendeten Pneumokokken wurden im Immunblot mit anti-SpsA Antiserum positiv für die SpsA-Expression getestet und die Stämme zeigten alle eine SC-Bindungsaktivität (Hammerschmidt *et al.*, 1997). HplgR produzierende MDCK Zellen wurden mit den zwei bekapselten Typ 2 Stämmen, ATCC 11733 und D39, einem bekapselten *S. pneumoniae* Typ 35A Stamm (NCTC 10319) und dem unbekapselten Stamm R6x infiziert. Unabhängig vom verwendeten Stamm zeigten die *spsA*-Mutanten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen eine deutlich verringerte Adhärenz und Invasion von Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen. Die Interaktion der Bakterien mit den Zellen erfolgte über das bakterielle Oberflächenprotein SpsA und war reduziert, wenn SpsA von den Pneumokokken nicht produziert werden konnte. Die absoluten Werte für die Adhärenz und Invasion lagen für die bekapselten Typ 2 Stämme deutlich niedriger als für den bekapselten Typ 35A Stamm und den unbekapselten R6x. Die Typ 2 Stämme wiesen in der Elektronenmikroskopie eine stärkere Bekapselung auf als der Typ 35A Stamm (M. Rohde, GBF, mündliche Information). Der Stamm R6x ist eine unbekapselte Variante des bekapselten Typ 2 Stamms D39. Die Ergebnisse zeigten, dass die Stärke der Kapselexpression und eventuell auch der Serotyp die Fähigkeit zur Anheftung an und Internalisierung in Calu-3 bzw. MDCK-hplgR Zellen beeinflusst. Für alle weiteren Infektionsversuche in der Zellkultur wurde der *S. pneumoniae* Typ 35A sowie die entsprechende *spsA*-defiziente Mutante verwendet.



Pneumolysin ist ein multifunktionales Toxin, das von nahezu allen klinischen Pneumokokken-Isolaten produziert wird (McDaniel *et al.*, 1987; Boulnois, *et al.*, 1991). Da es Epithelzellen während der Infektion schädigt (Mitchell and Andrew, 1997), wurden Mutanten konstruiert, die defizient für Pneumolysin waren (Zysk *et al.*, 2001). Der Einfluss des Pneumolysins auf die SpsA-vermittelte Infektion wurde in *in vitro* Infektionsversuchen analysiert. Die Infektion der plgR produzierenden Epithelzellen Calu-3 und MDCK-hplgR mit Pneumolysin-negativen Pneumokokken zeigte eine signifikante Steigerung der Adhärenz und Invasion im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtypstamm. Aufgrund der cytotoxischen Wirkung des Pneumolysins kommt es im Infektionsversuch mit Wildtyp-Pneumokokken nach 3-4 Stunden zur Schädigung der Zellen. Bei der Infektion mit dem Pneumolysin-defizienten Stamm bleiben die Zellen intakt und die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* konnte für Kinetikstudien verlängert werden. In weiteren Zellkulturversuchen wurde der Pneumolysin-negative Stamm daher insbesondere bei Transmigrationsstudien verwendet.

Die *spsA*-defizienten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae* hatten im Vergleich zum Wildtypstamm eine signifikant schwächere Bindung an die hplgR exprimierenden Epithelzellen Calu-3 und MDCK-hplgR gezeigt. Inhibitionsversuche mit rekombinanten SpsA-Derivaten und mit anti-SpsA Antiserum wurden in *in vitro* Infektionen mit hplgR produzierenden Epithelzellen durchgeführt, um die Funktion des Adhäsins SpsA und der identifizierten Bindungssepitope zu analysieren. Die Inkubation der Zellen wurde mit SpsA-SH2, dem prozessierten N-terminalen SpsA-Fragment, oder mit dem mutierten SpsA-SH2<sup>201</sup>, bei dem an Aminosäureposition 201 ein Tyrosin gegen eine Asparaginsäure ausgetauscht war, durchgeführt. In den Inhibitionsversuchen mit SpsA-SH2 wurde die Adhärenz und Invasion von *Streptococcus pneumoniae* Typ 35A signifikant reduziert. Das Protein konnte an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, diesen maskieren und die Interaktion mit den Pneumokokken blockieren. Bei der Inhibition der Infektion mit dem mutierten Protein SpsA-SH2<sup>201</sup> konnte dagegen kein signifikanter Unterschied im Adhärenz- und Invasionsverhalten nachgewiesen werden. Das mutierte Protein, welches in biochemischen Versuchen keine SpsA Bindungsaktivität aufwies, zeigte auch keine inhibitorische Aktivität. Des Weiteren erfolgte eine Ko-Kultivierung der

Pneumokokken in den *in vitro* Zellkulturexperimenten mit anti-SH2-IgG Antiserum. Das Antiserum reduzierte die Anheftung und Internalisierung auf ein Niveau, wie es für die *spsA*-Mutante gezeigt worden war. Die Antikörper maskierten das bakterielle Oberflächenprotein und blockierten die Interaktion mit dem zellulären plgR. Die Anzahl der adhären und invasiven Bakterien war vergleichbar niedrig wie die der *spsA*-Mutante. Die Inhibitionsversuche zeigten die wichtige Funktion des SpsA als Adhäsins im Infektionsprozess. Wird SpsA von den Pneumokokken nicht produziert oder wird seine Bindung an den hplgR blockiert, können die Bakterien nicht mehr an plgR-produzierende Zellen binden. Die Substitution der Aminosäure Tyrosin 201 in SpsA-SH2<sup>201</sup> mit Asparaginsäure hatte zur Folge, dass das Protein die Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit MDCK-hplgR nicht mehr blockieren konnte. Die *in vitro* Infektionen bewiesen daher auch die Funktion des Hexapeptids als essentielles Bindungsepitop für die SpsA-plgR vermittelte Infektion.

Das cholinbindende Protein SpsA von *Streptococcus pneumoniae* vermittelt die Adhärenz an plgR-produzierende Zellen über das Hexapeptid YRNYPT in SpsA. Die Funktion von SpsA als Adhäsins der Pneumokokken sollte auch direkt nachgewiesen werden. Die SpsA-Derivate SpsA-SH2, SpsA-SH12 und SpsA-SH2<sup>201</sup> wurden auf 3 µm großen Latexpartikeln immobilisiert und ihre Anheftung an Epithelzellen untersucht. Die Inkubation plgR produzierender Zellen mit SpsA-SH2- und SpsA-SH12- Latexbeads zeigte nach einer Stunde die Bindung der SpsA-Latexpartikel an die Epithelzelloberfläche. Latexbeads, auf denen das mutierte Protein SpsA-SH2<sup>201</sup> immobilisiert war, konnten dagegen nicht an Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen binden. In einer Zeitkinetik wurde nach vier Stunden Inkubation auf MDCK-hplgR Zellen die Internalisierung der Partikel in der Elektronenmikroskopie beobachtet. Die Interaktion von rekombinantem SpsA-Protein mit dem hplgR führt zur Bindung der Latexbeads an die Epithelzellen und schließlich zur Internalisierung der Partikel in das Zellinnere. Diese Ergebnisse bewiesen, dass ausschließlich die SpsA-plgR Interaktion ausreicht, um die Adhärenz und Internalisierung der Pneumokokken zu vermitteln.

Die Funktion des bakteriellen Proteins SpsA als Adhäsins und Virulenzfaktor wurde auch in *in vivo* Studien untersucht. Im Infektionsmodell der Ratte zeigte ein *spsA*-defizienter Bakterienstamm eine 100-fach geringere Kolonisierungsrate des Nasopharynx als der entsprechende Wildtyp (Rosenow *et al.*, 1997). Dagegen

wurden keine Unterschiede im systemischen Modell nachgewiesen. Die Interaktion von SpsA mit dem plgR wurde auch in *in vivo* Versuchen in der Maus analysiert. Dazu wurden plgR- und p62<sup>yes</sup>-defiziente Mäuse mit *S. pneumoniae* infiziert. Diese KO-Mäuse zeigten eine reduzierte Kolonisation von *Streptococcus pneumoniae* sowie einen verzögerten Ausbruch der Sepsis (Zhang *et al.*, 2000).

Bindungsanalysen in Immunblots und mittels der Sukroседichtegradienten Ultrazentrifugation (SDGU) hatten aber gezeigt, dass SpsA humanspezifisch an die SC und das SIgA bindet (Hammerschmidt *et al.*, 2000). Zur weiteren Untersuchung der Humanspezifität wurden *in vitro* Infektionsversuche mit stabil transfizierten MDCK Zellen durchgeführt. Die Zellen produzierten den humanen plgR, den Rezeptor aus der Maus oder aus dem Kaninchen. Die Infektionen der MDCK Zellen mit *S. pneumoniae* Typ 35A (NCTC 10319) bewiesen eine deutlich reduzierte Adhärenz und Invasion der Pneumokokken an Zellen, die den Rezeptor aus der Maus oder dem Kaninchen produzierten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der *S. pneumoniae* Stamm R6x humanspezifisch an die nasopharyngeale Zelllinie Detroit 562 bindet, die ebenfalls den hplgR produzieren, und in die Zellen eindringen kann (Brock *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse stehen daher im Widerspruch zu den *in vivo* Infektionsversuchen. Eine weitere Analyse der Wirtsspezifität erfolgte über die Oberflächenplasmonresonanz. Humane freie sekretorische Komponente sowie sekretorisches IgA zeigten die Bindung an nativ aufgereinigtes SpsA sowie an die rekombinanten N-terminalen SpsA-Derivate SH2, SH12 und SM1. Das mutierte SpsA-SH2<sup>201</sup>, mit einem Aminosäureaustausch an Position 201 im hexameren Bindungsmotiv, konnte weder an hFSC noch an SIgA binden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die sekretorische Komponente, aufgereinigt aus der Maus und der Ratte, sowie sekretorisches IgA, aufgereinigt aus Rind, Hund, Pferd, Meerschwein, Hamster, Maus, Kaninchen und Ratte, nicht an SpsA binden (Elm *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse bewiesen die humanspezifische Interaktion zwischen dem polymeren Immunglobulin-Rezeptor oder der sekretorischen Komponente und dem SpsA der Pneumokokken. Die Effekte in den *in vivo* Modellen und insbesondere in den KO-Mäusen sind aufgrund der Humanspezifität nicht zu erklären. Es ist aber bekannt, dass die p62<sup>yes</sup>-defizienten Mäuse einen Defekt in der Signaltransduktion haben, der die Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

Adhärenz- und Invasionsversuche von *Streptococcus pneumoniae* mit hplgR-exprimierenden Zellen haben die Funktion des bakteriellen Oberflächenproteins SpsA als Adhäsion gezeigt. Des Weiteren war bekannt, dass SpsA an die sekretorische Komponente des hplgR, die Ectodomäne dieses Transmembranproteins der Epithelzellen, bindet (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Die Rolle des Rezeptors im Invasionsprozess wurde in Inhibitionsversuchen mit freier sekretorischer Komponente, mit sekretorischem IgA und mit Antikörpern gegen die sekretorische Komponente analysiert. Die Pneumokokken wurden auch mit Serum IgA ko-kultiviert, das nicht an die Pneumokokken bindet. Die Inhibitionsversuche zeigten eine Reduktion der Adhärenz und Invasion bei Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen, wenn die Infektion in Gegenwart von anti-SC-Antikörpern durchgeführt wurde. Durch die Bindung der Antikörper an den Rezeptor war dieser für die Interaktion mit dem SpsA von *Streptococcus pneumoniae* blockiert und nicht mehr in der Lage, mit den Bakterien zu interagieren. Den gleichen Effekt zeigten ko-Kultivierungen der Pneumokokken in der Infektion mit freier sekretorischer Komponente (FSC) sowie mit sekretorischem IgA. Die Interaktion dieser Komponenten mit dem SpsA der Pneumokokken blockierte die Bindungsstelle für den hplgR und reduzierte die Adhärenz und Invasion der Bakterien an bzw. in die Zellen. Die Inkubation der Pneumokokken mit Serum IgA hatte dagegen keinen Einfluss auf die Anheftung der Bakterien. Die Inhibitionsversuche bewiesen, dass die Ectodomäne des plgR den zellulären Rezeptor für das Adhäsion SpsA darstellt. Ist diese Domäne nicht vorhanden, so wie in nicht-transfizierten MDCK Zellen, oder ist die Ectodomäne nicht humanspezifischer Natur, kann *Streptococcus pneumoniae* die Zellen nicht SpsA-vermittelt infizieren. Die Ergebnisse der SpsA-plgR Interaktion und die Inhibitionsexperimente in der Zellkultur deuteten auf ein humanspezifisches Bindungsepitop für das Adhäsion SpsA hin.

Die Sequenzen des plgR verschiedener Spezies wurden aufgeklärt (Tamer *et al.*, 1995). Daher sollte im weiteren Teil der Arbeit das oder die Bindungsmotive in der SC identifiziert werden. Dazu wurden zunächst chimere SC-Moleküle, bestehend aus Humanen- und Mausdomänen hergestellt. Der Einfluss der Domänen D1 bis D5 des extrazellulären Bereichs des hplgR an der Interaktion mit dem bakteriellen SpsA wurde im ELISA untersucht. Die verwendeten Konstrukte der chimere SC-Moleküle bestanden aus verschiedenen Kombinationen der fünf humanen bzw. Maus-SC-

Domänen. Bindungsversuche an die SpsA-Derivate SpsA-SH2, SpsA-SH3 und SpsA-SH2<sup>201</sup> zeigten, dass die beiden Domänen 3 und 4 des Rezeptors an der Bindung mit dem bakteriellen Oberflächenprotein SpsA beteiligt sind. Nur chimere Proteine, bei denen beide Domänen D3 und D4 humanen Ursprungs waren, zeigten eine Bindung an SpsA. Chimere SC-Moleküle, bei denen nur die Domäne D3 oder D4 humanen Ursprungs waren, zeigten keine Bindung an SpsA. Bindungsversuche mit dem SpsA-Derivat SH3 zeigten ebenfalls keine Interaktion mit den chimernen SC-Molekülen. Das SpsA Protein SH3 ist C-terminal verkürzt und besteht aus den Aminosäuren 37-158 des SpsA. Das Hexapeptid für die SC/plgR-Bindung ist deletiert, so dass dieses Derivat nicht an die chimernen SC-Moleküle binden kann. Des Weiteren wurde die Bindung des mutierten Proteins SpsA-SH2<sup>201</sup>, mit einem Aminosäureaustausch an Position 201 im Bindungsmotiv, an die chimernen Moleküle untersucht. Die Analysen zeigten keine Bindung des mutierten Proteins an den intakten humanen plgR oder an die chimernen Moleküle. Die Funktion der chimernen Moleküle wurde über die Bindung an dimeres IgA (dIgA) überprüft.

Zur Eingrenzung der Bindungsmotive und zur Identifizierung der minimalen SpsA-Bindungsmotive im humanen plgR wurde der extrazelluläre Teil des Rezeptors in 200 überlappende synthetische Peptide unterteilt und die jeweils 15 Aminosäuren langen Peptide auf einer Aminopegylat-Zellulosemembran immobilisiert. Nach der Inkubation der Membran mit SpsA wurden sechs potenzielle Bindungsmotive in den Domänen 1, 2, 3 und 4 detektiert. Das detektierte Motiv in Domäne 1 wurde nicht als spezifisches Bindungsmotiv betrachtet, da es mit der Bindungsdomäne für polymere Immunglobuline überlappte. Die weiteren potenziellen Motive waren in Domäne D2, Domäne D3 und Domäne D4 lokalisiert. Von diesen potenziellen Bindungsmotiven waren nach einer Computeranalyse der Oberflächenlokalisierung nur die Bereiche in D2 von Aminosäure 138-144, der Übergang von D2 zu D3 von Aminosäure 208-225 und das potenzielle Bindungsmotiv in D4 von Aminosäure 349-375 auf der Proteinoberfläche lokalisiert (Elm *et al.*, 2004).

Der Einfluss der identifizierten Bindungsdomänen auf die Interaktion des plgR mit SpsA wurde in *in vitro* Inhibitionsversuchen mit chimernen SC-Molekülen oder löslichen synthetischen Peptiden analysiert. Rekombinante humane sekretorische Komponente (hplgR), rekombinante SC der Maus (mplgR) sowie chimere SC-

Moleküle wurden im Infektionsversuch mit den Bakterien zur Inhibition eingesetzt. Der humane plgR reduzierte, ebenso wie die FSC, die Adhärenz der Pneumokokken an Calu-3 Epithelzellen. Dagegen hatte der plgR aus der Maus keinen Einfluss auf die Adhärenz der Pneumokokken. Die chimere SC-Moleküle hD4 und hD3D4 hingegen zeigten eine Reduktion der Adhärenz der Pneumokokken, während das chimere SC-Molekül hD3 keine Auswirkung auf die Bindung der Bakterien an die Zellen hatte. Die Proteine konnten während der Infektion mit dem SpsA der Pneumokokken interagieren, die Bindungsstelle blockieren und so die Infektion der Zellen inhibieren. Diese Ergebnisse bestätigten die Bindungsstudien des ELISA, zeigten aber auch die essentielle Rolle der Domäne D4 an dieser Interaktion auf.

Die synthetischen Peptide aus dem Bereich der Domäne 2, aus dem Übergangsbereich von Domäne 2 zu Domäne 3 sowie aus einem Teil der Domäne 3 beeinflussten die Adhärenz und Invasion der Bakterien nicht. Die Inhibition der Infektion von Calu-3 Zellen mit dem Peptid D4<sup>349-375</sup> zeigte eine drastische Reduktion der Adhärenz der Bakterien. Diese Ergebnisse bestätigten die wichtige Funktion der Domäne D4 und deuteten auf ein Bindungs-epitop in D4 im Bereich der Aminosäuren 349-375 des plgR hin. Die Funktion des potenziellen Bindungsmotivs in D3 konnte durch diese Versuche nicht eindeutig geklärt werden.

Die in der Spotmembran-Analyse identifizierten Peptidsequenzen wurden durch Deletionsmutagenese im Rezeptor deletiert. Der Rezeptor wurde nach der Transfektion in MDCK Zellen produziert und im Infektionsversuch mit SpsA-Latexbeads auf die SpsA-plgR Interaktion untersucht. Die Deletion der Aminosäuren 133-148 in Domäne 2 hatte keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der SpsA-Latexbeads an die transfizierten Zellen. Die Deletion der Aminosäuren 349-375 in Domäne 4 zeigte dagegen eine deutlich reduzierte Bindung von SpsA-gekoppelten Latexbeads im Vergleich zu Zellen, die den intakten hplgR produzierten. Für die Aminosäuren 206-229 in Domäne 3 konnte ebenfalls eine verringerte Bindung von SpsA-Latexbeads nachgewiesen werden. Die Bindung der SpsA-Latexbeads an den Rezeptor mit der Deletion in Domäne 2 bewies die Produktion des plgR durch die Zellen. Des Weiteren zeigte der Rezeptor Bindungsaktivität an SpsA-Latexbeads. Die Deletionsmutagenese identifizierte zwei potenzielle Bindungsmotive im hplgR für das bakterielle SpsA. Die Motive sind an den Aminosäurepositionen 206-229 in

Domäne 3 und 349-375 in Domäne 4 lokalisiert. Ein Einfluss der Domänen 1, 2 und 5 an dem Bindungsprozess kann ausgeschlossen werden. Computergestützte Analysen des Hydratisierungsgrads der Aminosäuren im plgR zeigten, dass die zwei identifizierten Regionen mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche des Rezeptors lokalisiert sind. Die SpsA-Bindungsmotive konnten durch die Deletionsmutagenese auf die beiden Regionen an Aminosäureposition 206-229 in Domäne 3 und 349-375 in Domäne 4 eingegrenzt werden.

Deletionen im humanen plgR, bei denen die einzelnen Domänen des Rezeptors vom N-terminalen bzw. C-terminalen Ende sukzessive entfernt wurden, konnten die Beteiligung der Domänen D3 und D4 an der Interaktion mit SpsA bestätigen (Lu *et al.* 2003). Des Weiteren wird die Bindung von dimerem IgA an die sekretorische Komponente des plgR über Bindungsmotive in den Domänen 1 und 5 des Rezeptors vermittelt (Bakos *et al.*, 1991; Coyne *et al.*, 1994; Hexham *et al.*, 1999; Crottet und Cortesy, 1999). Die Konformation des Rezeptors spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion des plgR mit SpsA. Die Zerstörung der Konformation des Rezeptors durch Behandlung mit DTT, das die Disulfidbrücken im plgR schädigte, zeigte eine Reduktion der Interaktion mit SpsA (Lu *et al.*, 2003).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen des plgR in verschiedenen Spezies zeigte die Sequenzunterschiede zwischen der Humanen und der Maus-, Kaninchen- oder Ratten-Sequenz. Zwischen dem humanen plgR und dem Rezeptor der Maus besteht eine Sequenzidentität von nur 67 % (Tamer *et al.*, 1995). Aufgrund der Humanspezifischen Interaktion zwischen SpsA und dem plgR wurden zwei Motive aus der identifizierten Bindungsregion in Domäne D4 gegen die Aminosäuren der Maus ausgetauscht. Des Weiteren wurde ein Motiv in Domäne D2 des humanen plgR mutiert. Diese in der Spotmembran Analyse identifizierte Region war als Bindungsmotiv ausgeschlossen worden. Weiterhin sind die Aminosäuren dieser Regionen mit hoher Wahrscheinlichkeit Oberflächenlokalisiert. Der veränderte Rezeptor wurde in MDCK Zellen exprimiert und in Bindungsversuchen *in vitro* auf die Interaktion mit SpsA-Latexbeads untersucht. Der Austausch der Aminosäuren 357-361 in Domäne D4 gegen die entsprechenden Aminosäuren der Maus hatte keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von SpsA-Latexbeads. Der Austausch der humanen Aminosäuren 382-386 gegen die Aminosäuren der Maus in Domäne D4 zeigte dagegen eine deutliche Reduktion der Bindung von SpsA-Latexbeads an den

Rezeptor. Die Beteiligung der humanen Domäne D2 an der Interaktion von SpsA mit dem plgR konnte auch in diesen Versuchen ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse grenzten das SpsA-Bindungsmotiv in Domäne D4 des hplgR auf ein fünf Aminosäuren langes Motiv ein. Die Aminosäuren an Position 382-386 sind essentiell für die Interaktion des humanen plgR mit dem bakteriellen SpsA. Das durch Deletionsmutagenese in Domäne D3 identifizierte Bindungsmotiv muss noch weiter untersucht werden.

*Streptococcus pneumoniae* bindet über das Adhäsın SpsA an die mukosalen Epithelzellen Calu-3 und an stabil transfizierte MDCK-hplgR. Durch diese Interaktion internalisieren Pneumokokken in die Zellen. Untersuchungen zur Internalisierung sowie der Transmigration der Pneumokokken durch polarisierte Epithelzellen wurden in Infektionsversuchen im Zwei-Kammer-System durchgeführt. Die Zellen wurden so ausgesät, dass eine Infektion i) von apikal ii) von basal möglich wurde. Polarisierte Calu-3 Zellen wurden auf ihrer basolateralen Oberfläche mit *S. pneumoniae* Typ 35A (NCTC 10319) infiziert. Eine Stunde nach dem Start der Infektion wurden die Bakterien an der basolateralen Oberfläche der Zellen nachgewiesen. Die Interaktion des bakteriellen SpsA mit dem hplgR führte zur Adhärenz der Pneumokokken an Calu-3 Zellen. Es folgte die SpsA-plgR vermittelte Internalisierung der Bakterien in die Zellen. Ab etwa drei Stunden nach dem Infektionsstart konnten die Pneumokokken auf der apikalen Oberfläche detektiert werden. Die Infektion polarisierter Calu-3 Zellen auf der apikalen Oberfläche zeigte eine deutlich verzögerte Transmigration der Bakterien. Was nach der Internalisierung der Pneumokokken in die Epithelzelle geschieht und wie die Transmigration organisiert ist, konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Es wurde gezeigt, dass die Produktion der sekretorischen Komponente in respiratorischen Epithelzellen durch die Polarisierung der Zellen beeinflusst ist (Fiedler *et al.*, 1991). Weiterhin ist bekannt, dass Zytokine wie IFN- $\gamma$  (Piskurich *et al.*, 1993), Interleukin-4 (Phillips *et al.*, 1990; Denning, 1996), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Kvale *et al.*, 1988), TGF- $\beta$  (McGee *et al.*, 1991) und Interleukin 1  $\alpha$  und  $\beta$  (IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) (Hayashi *et al.*, 1997) die Produktion von sekretorischem IgA in intestinalen Epithelzellen steigern können. Durch die Zugabe von IFN- $\gamma$  zu plgR produzierenden Zellen konnte innerhalb von 48 bis 72 Stunden eine gesteigerte SC Produktion sowie eine gesteigerte Transcytose von dIgA in Calu-3 erreicht werden (Godding *et al.*, 1998).



Für das bakterielle Oberflächenprotein SpsA konnte neben der Bindung an den humanen pIgR die Interaktion mit anderen Wirtszellfaktoren, wie dem Komplementprotein C3 (Cheng *et al.*, 2000) oder dem Komplementfaktor H (Janulczyk *et al.*, 2000; Dave *et al.*, 2001; Duthy *et al.*, 2002) gezeigt werden. Die Bindung von Faktoren des Komplementsystems könnte eine weitere Strategie der Bakterien darstellen, dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. Sie könnten aber auch Brückenmoleküle für die Anheftung an die Zellen darstellen (Wurzner, 1999). Die Rolle dieser Interaktionen von *Streptococcus pneumoniae* mit dem Komplementsystem ist bisher wenig bekannt und muss noch genauer untersucht werden.

Immunglobuline, wie zum Beispiel IgA, IgG und IgM, werden ebenfalls durch polarisierte Epithelzellen transportiert (Rojas und Apodaca, 2002). Sie spielen eine wichtige Rolle im Kampf gegen bakterielle und virale Erkrankungen, indem sie an die Erreger binden und diese neutralisieren. Die Immunglobuline können zwar nicht durch die epitheliale Barriere der Schleimhaut diffundieren, werden aber von zwei Rezeptoren, dem pIgR und dem FcRn durch die Zellen transportiert. IgG bindet an den Rezeptor FcRn und gelangt über ihn durch die Zellen hindurch. Dimeres IgA und pentameres IgM wird an der basolateralen Oberfläche der Epithelzellen vom polymeren Immunglobulin-Rezeptor gebunden und auf die apikale Oberfläche transportiert. Der intrazelluläre Transport des pIgR-dIgA Komplexes wurde an polarisierten MDCK Zellen studiert, die mit *pigr* cDNA transfiziert waren. Die Internalisierung des Komplexes erfolgt durch Clathrin gekoppelte Vertiefungen an der basalen Oberfläche der Zellen. Hierbei werden die beiden Tyrosin Reste an den Aminosäurepositionen 668 und 734 des pIgR benötigt. In die Zelle aufgenommene Komplexe gelangen in sogenannte frühe Endosomen (early endosomes), die an der basolateralen Peripherie lokalisiert sind. Der weitere Transport führt über die sogenannten späten Endosomen (late endosomes) zur apikalen Oberfläche der Zellen, wo sekretorisches IgA oder freie sekretorische Komponente proteolytisch abgespalten wird (Rojas und Apodaca, 2002). Der Transport wird durch das Zytoskelett unterstützt. Mikrotubuli sind für die Übertragung des pIgR-dIgA Komplexes aus den basolateralen frühen Endosomen in apikal liegende Bereiche notwendig. Das Aktin scheint ebenfalls eine wichtige Rolle für die Transmigration zu spielen, da die Behandlung mit Cytochalasin D die Transmissionsrate in MDCK-

hplgR Zellen deutlich reduzierte (Hunziker *et al.*, 1990; Maples *et al.*, 1997). Wie das Aktin in den Transportprozess eingreift, und ob es an der Transmigration der Pneumokokken von der apikalen zur basolateralen Oberfläche beteiligt ist, wurde noch nicht aufgeklärt. Der Transport des plgR-dIgA Komplexes wird durch verschiedene Rab-GTPasen (Hunziker und Peters, 1998; Wang *et al.*, 2000; van IJzendoorn *et al.*, 2002) reguliert. So scheint zum Beispiel die Menge des zur Verfügung stehenden dIgA die Komplexbildung mit dem plgR zu regulieren, wodurch größere Mengen an sekretorischem IgA auf die apikale Oberfläche transportiert werden können (Giffroy *et al.*, 1998). Neben den GTPasen der Rab-Familie sind auch die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 an der Steuerung des Transports beteiligt. RhoA und Rac1 sind für die Aufnahme des plgR-dIgA Komplexes in die Zelle verantwortlich. Cdc42 reguliert ebenso die Internalisierung des Komplexes sowie dessen Transzytose durch die Zelle. Weiterhin steuern verschiedene Signalkaskaden (van IJzendoorn *et al.*, 2002; Luton und Mostov, 1999) den Transport des plgR-dIgA Komplexes durch die Zellen hindurch. So wird zum Beispiel die p62<sup>ves</sup> Signalkaskade aktiviert sobald dIgA vom plgR gebunden wird. Die Signalkaskade wird auf der basolateralen Seite der Zelle ausgelöst, durch die Zelle übertragen und stimuliert die Transmigration von dIgA, das schon in die Zellen aufgenommen wurde (Luton und Mostov, 1999). Die Beteiligung dieser verschiedenen Komponenten an der Steuerung des Transports von Pneumokokken von der apikalen zur basolateralen Seite der Epithelzellen wurde bisher noch nicht genauer analysiert. Untersuchungen zur Regulation der Transmigration in der Zelle sind aber nötig, um den Infektionsweg der Pneumokokken über den plgR besser zu verstehen.

*Streptococcus pneumoniae* bindet den plgR an der apikalen Oberfläche respiratorischer Epithelzellen, um Zugang zu den polarisierten Zellen zu bekommen. Durch die Bindung an die sekretorische Komponente könnten die Bakterien bei der Rückführung des Rezeptors in die Zellen eingeschleust und durch diese hindurch transportiert werden (Kaetzel, 2001). Auf der apikalen Oberfläche der mukosalen Epithelzellen wird IgA, gebunden an die sekretorische Komponente des Rezeptors (sekretorisches IgA), proteolytisch abgespalten. Ebenso wird der unbeladene plgR von der basolateralen zur apikalen Seite durch die Zellen transportiert und freie sekretorische Komponente (SC) abgespalten. Die freie sekretorische Komponente trägt zur Abwehr möglicher Erreger bei, wie es zum Beispiel für Enterotoxin bildende

*Escherichia coli* gezeigt werden konnte (de Oliveira *et al.*, 2001). SC bindet an Kolonisationsfaktoren dieser Erreger und reduziert deren Infektionsrate. Die plgR-vermittelte Internalisierung von Pathogenen wird durch verschiedene Faktoren erschwert. Die proteolytische Abspaltung der sekretorischen Komponente an der apikalen Oberfläche reduziert die Zahl der zur Verfügung stehenden plgR Moleküle, an die Pneumokokken binden können. Außerdem ist die erneute Internalisierung des Rezeptors an der apikalen Oberfläche im Vergleich zur Internalisierung an der basolateralen Oberfläche deutlich uneffizienter. Des Weiteren können in Anwesenheit der freien sekretorischen Komponente sowie von sekretorischem IgA die Bindungsstellen potenzieller pathogener Erreger blockiert werden, so dass eine Bindung an den hplgR reduziert wird (Kaetzel, 2001). *Streptococcus pneumoniae* muss alle diese Hindernisse umgehen, um über den plgR in die mukosalen Epithelzellen gelangen zu können.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 *Streptococcus pneumoniae* Stämme

| Stammbezeichnung | Quelle     | Serotyp | Referenz                           |
|------------------|------------|---------|------------------------------------|
| P 37             | NCTC 10319 | 35A     | Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997 |
| P 51             | ATCC 11733 | 2       | Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997 |
| P 115 (D39)      | Laborstamm | 2       |                                    |
| P 139 (R6x)      | Laborstamm | -       | Avery <i>et al.</i> , 1944         |

**Tabelle12:** Verwendete *S. pneumoniae* Stämme

| Stamm-bezeichnung | Wildtyp     | Plasmid             | mutiertes Gen | Antibiotika-Resistenz | Referenz                           |
|-------------------|-------------|---------------------|---------------|-----------------------|------------------------------------|
| PN 65             | NCTC10319   | pJDC9 :: <i>pdB</i> | <i>pdB</i>    | erm <sup>R</sup>      | Elm <i>et al.</i> , 2004           |
| PN 8.1            | NCTC10319   | pMSH4.1             | <i>spsA</i>   | erm <sup>R</sup>      | Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2000 |
| PN 9.1            | ATCC11733   | pMSH4.1             | <i>spsA</i>   | erm <sup>R</sup>      | Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2000 |
| PN10.1            | P 139 (R6x) | pMSH4.1             | <i>spsA</i>   | erm <sup>R</sup>      | Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2000 |

**Tabelle 13 :** Verwendete *S. pneumoniae* Mutanten

#### 5.1.2 *Escherichia coli* Stämme

M15 [pREP4] (QIAGEN)

Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, rif<sup>S</sup>, lac<sup>-</sup>, ara<sup>-</sup>, gal<sup>-</sup>, mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>

XL1-Blue MRF' (Stratagene)

$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 } supE44 \text{ thi-1 } recA1 \text{ gyrA96 } relA1 \text{ lac[F'proAB lacI}^q\text{Z}\Delta M15 \text{ Tn10(Tet}^r\text{)]}^c$

DH5 $\alpha$

$\Delta(lac)U169, \text{ endA1, } gyrA46, \text{ hsdR17, } \Phi80\Delta(lacZ)M15, \text{ recA1, } relA1, \text{ supE44, } \text{ thi-1}$  (Sambrook *et al.*, 1989)

TOP 10 / One Shot<sup>TM</sup> Zellen

Kompetente *E. coli* aus dem TOPO<sup>TM</sup> TA Cloning Kit von Invitrogen

### 5.1.3 Nährmedien und Kulturbedingungen

**S. pneumoniae** Stämme wurden aus der Glycerin-Stammkultur auf **Blutagarplatten** über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Platten konnten für 2-3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

**Blutagarplatten** (Merck, Oxoid)

Zusammensetzung laut Hersteller:

23 g Peptone, 5 g NaCl, 14 g Agar, 65 ml Hammelblut, pH 7.4

Als Flüssigmedium wurde standardmäßig **THY** verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5.

**THY** (Todd-Hewitt-Medium mit Hefeextrakt)

36,4 g THB pro Liter H<sub>2</sub>O (laut Angabe), 0,5 % Hefeextrakt, autoklaviert

Weiterhin wurden die Pneumokokken in **CpH8-Medium** kultiviert (nach Lacks und Hotchkiss, 1960). *S. pneumoniae* entwickelt in diesem semisynthetischen Komplettmedium eine eigene Kompetenz, die für die Übertragung von Plamid-DNA ausgenutzt wurde.

**CpH8:**

Zusammensetzung aus folgenden Einzelkomponenten:

800 ml Pre C  
26 ml Supplement  
20 ml Glutamin (0,1 %)  
20 ml Adams III  
10 ml Natriumpyruvat (2 %)  
30 ml Phosphatpuffer, pH 8,0  
18 ml Hefeextrakt (5 %)

Zusammensetzung der Einzelkomponenten:

|                 |   |
|-----------------|---|
| PreC:           | 1,208 g Natrium-Acetat, 5 g Caseinhydrolysat, 5 mg L-Tryptophan, 5 mg L-Cystein<br>ad 1 l mit H <sub>2</sub> O, pH 7,5 mit NaOH |
| Supplement:     | 60 ml '3 in 1' Salze, 120 ml Glukose (20 %), 6 ml Saccharose (50 %), 120 ml Adenosin (2 mg/ml), 120 ml Uridin (2 mg/ml)         |
| Adams III:      | 160 ml Adams I, 40 ml Adams II, 2 g L-Asparagin, 400 mg Cholin-HCl, 17 mg CaCl <sub>2</sub>                                     |
| Phosphatpuffer: | 947 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M), 53 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)   |

Zusätze der Einzelkomponenten:

|          |   |
|----------|---|
| Adams I: | 0,15 mg Biotin, 150 mg Nikotinsäure, 175 mg Pyridoxin-HCl, 600 mg Ca-Pantothenat, 160 mg Thiamin-HCl, 70 mg Riboflavin<br>ad 1 l mit H <sub>2</sub> O |
|----------|---|

|               |  |
|---------------|--|
| Adams II:     | 500 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 500 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ , 500 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 200 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ , 10 ml HCl konz.<br>ad 1 l mit $\text{H}_2\text{O}$ |
| 3 in 1-Salze: | 100 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ , 500 mg $\text{CaCl}_2$ , 3,3 mg $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$<br>ad 1 l mit $\text{H}_2\text{O}$   |

***E. coli* Stämme** wurden auf **LB-Agar-Platten** mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium schüttelnd bei 37 °C. Bei Bedarf konnten die Stämme auf LB-Agar-Platten für einige Tage bis Wochen im Kühlschrank (4 °C) gelagert werden.

#### **LB (Luria-Bertani-) Medium**

10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt,  
pH 7.4 mit 5 N NaOH eingestellt, autoklaviert

#### **LB-Agarplatten**

LB-Medium + Bacto-Agar (1,5 % final)

#### **Stammmhaltung**

*S. pneumoniae*- und *E. coli*-Stämme wurden unter den genannten Kulturbedingungen angezogen und mit Glycerin in einer Endkonzentration von 25 % gemischt tiefgefroren. Die Bakterienstämme wurden so über längere Zeiträume (bis zu Jahren) bei –80 °C aufbewahrt.

### 5.1.4 Antibiotika

| Antibiotikum    | Konzentration<br><i>E. coli</i>                       | Konzentration<br><i>S. pneumoniae</i> | Lösungsmittel     |
|-----------------|---|---------------------------------------|-------------------|
| Ampicillin      | 100 µg ml <sup>-1</sup>                               | 100 µg ml <sup>-1</sup>               | dH <sub>2</sub> O |
| Kanamycin       | 50 µg ml <sup>-1</sup>                                | 50 µg ml <sup>-1</sup>                | dH <sub>2</sub> O |
| Erythromycin    | 250 µg ml <sup>-1</sup>                               | 5 µg ml <sup>-1</sup>                 | 70 % Ethanol      |
| Tetracyclin     | 10 µg ml <sup>-1</sup>                                | 10 µg ml <sup>-1</sup>                | Methanol          |
| Spectinomycin   | 100 µg ml <sup>-1</sup>                               | 50 µg ml <sup>-1</sup>                | dH <sub>2</sub> O |
| Chloramphenicol | 50 µg ml <sup>-1</sup>                                | 8 µg ml <sup>-1</sup>                 | 100 % Ethanol     |
| Penicillin      | 10000 Units ml <sup>-1</sup> für die Zellkultur (PAA) |                                       |                   |
| Streptomycin    | 10 mg ml <sup>-1</sup> für die Zellkultur (PAA)       |                                       |                   |

**Tabelle 14** : Antibiotikakonzentrationen

### 5.1.5 Antikörper

#### Enzym-konjugierte Antikörper

Schwein-Anti-Kaninchen IgG Peroxidase konjugierte DAKO  
 Anti-Digoxigenin F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente Peroxidase konjugierte Roche

#### Fluorochrom markierte Antikörper

Alexa 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG MoBiTec  
 Alexa 568 Ziege Anti-Kaninchen IgG MoBiTec

#### nicht markierte Antiseren

Kaninchen-anti-*S.pneumoniae* (P139 und P51) Eurogentec  
 Kaninchen-anti-SpsA(SH2) Eurogentec  
 Kaninchen-anti-hplgR(SC) J.-P. Vaerman  
 (Brüssel, Belgien)

### 5.1.6 Enzyme

| Restriktionsendonuklease | Schnittstelle |
|--------------------------|---------------|
| <i>Bam</i> HI            | G↓GATCC       |
| <i>Eco</i> RI            | G↓AATTC       |
| <i>Hind</i> III          | A↓AGCTT       |
| <i>Not</i> I             | GC↓GGCCGC     |
| <i>Xho</i> I             | C↓TCGAG       |
| <i>Sma</i> I             | CCC↓GGG       |
| <i>Sph</i> I             | GCATG↓C       |
| <i>Sac</i> II            | CCGC↓GG       |

|  |            |
|--|------------|
| BioThermStar™ Taq-Polymerase (5000 U ml <sup>-1</sup> )  | Genecraft  |
| Pwo DNA-Polymerase                                       | Hybaid AGS |
| Expand™ -DNA-Polymerase (3500 U ml <sup>-1</sup> )       | Roche      |
| T4-DNA-Ligase (400000 U ml <sup>-1</sup> )               | Roche      |
| M-MLV Reverse Transkriptase (200000 U ml <sup>-1</sup> ) | Gibco      |
| Alkalische Phosphatase                                   | NEB        |
| Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I)                          | NEB        |
| RNaseA   | AppliChem  |
| DNase  | Boehringer |
| Pronase E  | Merck      |

### 5.1.7 Lösungen und Puffer

|   |   |
|---|---|
| Acetat-Puffer                             | 0,1 M Natrium-Acetat, pH 4,0 mit Eisessig eingestellt   |
| Agarosegel Loading Dye                    | 0,25 % Bromphenol Blau, 40 % Sucrose  |
| Affinitätschromatographie, nativ:         |   |
| Lysepuffer                                | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, pH 8,0  |
| Waschpuffer                               | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0  |
| Elutionslösung                            | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0   |
| Affinitätschromatographie, denaturierend: |   |
| Puffer A                                  | 4 M Harnstoff, 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01 M Tris, pH 8   |
| Puffer B                                  | 4 M Harnstoff, 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01 M Tris, pH 4,5   |
| Puffer C                                  | 4 M Harnstoff, 0,2 M EtAc   |
| Chloronaphthol                            | 20 % in Methanol  |
| Coomassie-Färbelösung                     | 50 % Methanol, 5,8 % Eisessig, 0,2 % Coomassie  |
| Coomassie-Entfärber                       | 40 % Methanol, 10 % Eisessig  |
| 50 × Denhardt's                           | 1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidin, 1 % BSA (alle w/v)   |
| Ethidium-Bromid Färbelsg.                 | 100 µl EtBr Flüssigstocklösung in 200 ml dH <sub>2</sub> O  |
| High-SDS-Puffer                           | 7 % SDS, 50 % Formamid, 5 x SSC, 50 mM NaPO <sub>3</sub> , pH 7,0, 0,1 % N-Laurylsarcosin, 2,0 % Blockreagenz (Roche) |
| Hybridisierungs-Puffer                    | 6 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,5 % SDS  |
| IPTG-Stock                                | 1 M IPTG in H <sub>2</sub> O  |
| 10 × KGB-Puffer                           | 1 M Kaliumglutamat, 0,25 M Tris-Acetat (pH 7,6), 0,1 M Mg-Acetat, 0,5 mg/ml BSA, 5 mM β-Mercaptoethanol               |
| Lysepuffer für Pneumolysintest            | 10 mM DTT, 0,1 % BSA in PBS, pH 7,4   |
| Lysozym                                   | 5 mg/ml in TES  |
| 10 x MOPS-Puffer                          | 200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7,0  |
| Mutanolysin                               | 1 mg/ml in Tris, pH 7,5   |
| Natrium-Acetat Lösung                     | 3 M Natrium Acetat, pH 5,2 mit Eisessig einstellen  |



|   |  |
|---|--|
| PBS                                       | 1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4     |
| PBST                                      | PBS mit 0,05 % Tween 20  |
| Phenol/Chloroform                         | 50 % Phenol, 50 % Chloroform   |
| Plasmid-Miniprep. Lösung I                | 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA   |
| Plasmid-Miniprep. Lösung II               | 4 mg/ml Lysozym jeweils frisch zugeben   |
| Plasmid-Miniprep. Lösung III              | 0,2 N NaOH, 1 % SDS  |
| Pronase                                   | 7,5 M Ammonium Acetat  |
| RNase                                     | 5 mg/ml (30 min bei 37 °C vorinkubieren)   |
| Roti <sup>®</sup> -Blue Färbelösung       | 5 mg/ml TES (15 min bei 100 °C inkubiert)  |
| 8 × SDS-PAGE-Laufpuffer                   | 20 ml Waschlösung + 5 ml Roti Blue (5 fach konzentriert)   |
| Sarkosyllösung                            | 0,12 M Tris, 0,96 M Glycin, 0,5 % SDS  |
| SDS-PAGE-Probenpuffer                     | 10 % Sarkosyl in 250 mM EDTA   |
| Semidry-Blotting Puffer                   | 25 % 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 5 % SDS, 5 % Bromphenolblaulösung, 10 % 2-Mercaptoethanol |
| Spotmembran-Puffer A                      | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol   |
| Spotmembran-Puffer B                      | 8 M Harnstoff, 1 % SDS, 0,5 % Mercaptoethanol  |
| 2 × SSC                                   | 10 % Essigsäure, 50 % Ethanol, 40 % dH <sub>2</sub> O  |
| Substrat-Puffer                           | 0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7,0  |
| Sucrose-TES                               | 0,1 M Tris, 0,5 mM $\text{MgCl}_2$ , pH 9,5  |
| 50 × TAE                                  | 20 % Sucrose in TES, pH 8,0  |
| TBS                                       | 2 M Tris, 0,6 M EDTA, 0,57 % Eisessig  |
| TBS-Tween                                 | 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl   |
| TE (Tris/EDTA)                            | 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20  |
| TE 10/1                                   | 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0  |
| Terminator Ready Reaction Mix             | 10 mM Tris / 1 mM EDTA   |
| TES (Tris EDTA Saline)                    | 5 × PCR-Puffer, Dey-Deoxynukleotide (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin), Ampli taq-Polymerase, dNTP-Mix  |
| Waschlösung (für Roti <sup>®</sup> -Blue) | 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl  |
| X-Gal                                     | 100 ml Methanol + 300 ml dH <sub>2</sub> O   |
|   | 0,2 g 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid in 10 ml Dimethylformamid (DMF) oder in 10 ml DMSO |

### 5.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen und Sigma bezogen.

Oligonukleotide zur Amplifizierung verschiedener Regionen des *pigr* Gens zur Klonierung in pQE 30

| Name      | Sequenz (5' → 3')                                    | T <sub>m</sub> | Schnittstelle   | Position im hplgR                       |
|-----------|--|----------------|-----------------|---|
| IGR 1     | GCCGAGGCCTGTCCTTTGATG                                | 68 °C          | -               | Domäne 1 - Forward<br>ab Nukleotid 347  |
| IGR 2     | CACTTGGAGGTCAGCATTCTTC                               | 66 °C          | -               | Domäne 2 – Reverse<br>ab Nukleotid 711  |
| IgR1f     | (GC) <sub>3</sub> GCATGCAAGAGTCCCATATTT<br>GGTCCCG   | 66 °C          | <i>Sph</i> I    | Domäne 1 – Forward<br>ab Nukleotid 55   |
| Igr1bf    | (GC) <sub>3</sub> GGATCCAAGAGTCCCATATTT<br>GGTCCCG   | 66 °C          | <i>Bam</i> H I  | Domäne 1 - Forward<br>ab Nukleotid 55   |
| IgR2f     | (GC) <sub>3</sub> GCATGCCTCCTAAATGACACT<br>AAAGTCTAC | 66 °C          | <i>Sph</i> I    | Domäne 2 – Forward<br>ab Nukleotid 397  |
| IgR2bf    | (GC) <sub>3</sub> GGATCCCTCCTAAATGACACT<br>AAAGTCTAC | 66 °C          | <i>Bam</i> H I  | Domäne 2 – Forward<br>ab Nukleotid 397  |
| IgR3f     | (GC) <sub>3</sub> GCATGCCTAAAGCCCGAGCC<br>CGAGC      | 64 °C          | <i>Sph</i> I    | Domäne 3 – Forward<br>ab Nukleotid 712  |
| IgR4f     | (GC) <sub>3</sub> GCATGCATTCCCCGCAGCCC<br>CACTG      | 64 °C          | <i>Sph</i> I    | Domäne 4 – Forward<br>ab Nukleotid 1054 |
| IgR2r     | (GC) <sub>3</sub> AAGCTTCACTTGGAGGTCAGC<br>ATTCTTC   | 66 °C          | <i>Hind</i> III | Domäne 2 – Reverse<br>ab Nukleotid 711  |
| IgR3r     | (GC) <sub>3</sub> AAGCTTCGTGGACTCCTCATT<br>GACGAAGAG | 74 °C          | <i>Hind</i> III | Domäne 3 – Reverse<br>ab Nukleotid 1053 |
| IgR4r     | (GC) <sub>3</sub> AAGCTTGTTTGGTTCTCCTTC<br>GATAATC   | 62 °C          | <i>Hind</i> III | Domäne 4 – Reverse<br>ab Nukleotid 1389 |
| IgR5R     | GCGCGCAAGCTTTAGGCTGACATC<br>GCGGGACC                 | 66 °C          | <i>Hind</i> III | Domäne 5 – Reverse<br>ab Nukleotid 1725 |
| IgR6R     | GCGCGCAAGCTTCTCTGCAAAAAG<br>CCTGGGATC                | 64 °C          | <i>Hind</i> III | Domäne 6 – Reverse<br>ab Nukleotid 1821 |
| IGRstartF | GCGCGCGAATTCTTTGCTGCTCTTC<br>GTGCTCACC               | 68 °C          | <i>Eco</i> RI   | hu-plgR Start<br>ab Nukleotid 1         |
| IGRstopR  | GCGCGCCCCGGGCTAGGCTTCCT<br>GGGGGCCGTC                | 72 °C          | <i>Sma</i> I    | hu-plgR Stop<br>ab Nukleotid 2295       |

**Tabelle15** : Oligonukleotide für die PCR im hu-*pigr*

Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese („site-directed mutagenesis“) im *pigr* Gen

| Name                 | Sequenz (5' → 3')  | Position   |
|----------------------|--|--|
| <b>plgRatMutF</b>    | CATCAACTGCCCTTTCAAGACTGGGAAT<br>GCTCATAGCAAGAAGTCCTTGTACAAGC<br>AGATAG     | Forward-Primer für Austausch der Nukleotide 469 – 486 des hu-plgR zu „rat-plgR“    |
| <b>plgRatMutR</b>    | CTATCTGCTTGTACAAGGACTTCTTGCTA<br>TGAGCATTCCCAGTCTTGAAAGGGCAGT<br>TGATG     | Reverse-Primer für Austausch der Nukleotide 469 – 486 des hu-plgR zu „rat-plgR“    |
| <b>plgRabbitMutF</b> | CCATCAACTGCCCTTTCAAGACTGCGACT<br>AGGCAACTAAAGAAGTCCTTGTACAAGC<br>AGATAGGC  | Forward-Primer für Austausch der Nukleotide 469 – 486 des hu-plgR zu „rabbit-plgR“ |
| <b>plgRabbitMutR</b> | GCCTATCTGCTTGTACAAGGACTTCTTTA<br>GTTGCCTAGTCGCGAGTCTTGAAAGGGCA<br>GTTGATGG | Reverse-Primer für Austausch der Nukleotide 469 – 486 des hu-plgR zu „rabbit-plgR“ |
| <b>PlgRMausMut1f</b> | GCCGTGCTCTGCCCCTACAAGTGGTGTG<br>GCTGGGAAAGCATCAAGTACTGG                    | Forward-Primer für Austausch der Nukleotide 1122 - 1134 des hu-plgR zu „Maus-plgR“ |
| <b>PlgRMausMut1r</b> | CAGAGACACCAGTACTTGATGCTTTCCC<br>AGCGACACCAGTTGTAGGGGCAGAGCA<br>CGGC        | Reverse-Primer für Austausch der Nukleotide 1122 – 1134 des hu-plgR zu „Maus-plgR“ |
| <b>PlgRMausMut2f</b> | GCCGCTGCCCCCTGCTGGTGGGAAGAGTA<br>TGAAGGCGTTAAGGCCAGTACGAGGG<br>CCGCC       | Forward-Primer für Austausch der Nukleotide 1197 – 1209 des hu-plgR zu „Maus-plgR“ |
| <b>PlgRMausMut2r</b> | GGCGGCCCTCGTACTGGGCCTTAACGCC<br>TTCATACTCTTCCACCAGCAGGGGGCAG<br>CGGC       | Reverse-Primer für Austausch der Nukleotide 1197 – 1209 des hu-plgR zu „Maus-plgR“ |

**Tabelle 16:** Oligonukleotide für die site-directed-mutagenesis im hu-*pigr*

Oligonukleotide für die Herstellung von Deletions-Mutanten „in frame“ im *pigr* durch inverse PCR

| Name                | Sequenz (5' → 3')                                 | T <sub>m</sub> | Schnittstelle | Position  |
|---------------------|---|----------------|---------------|---|
| <b>PIGRDEL 1</b>    | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGAAGC<br>AGATAGGCCTGTAC<br>CCTG | 64 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 2 des <i>pigr</i> (reverse) ab Nukleotid 499           |
| <b>PIGRDEL 2</b>    | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGGATG<br>GTCACCGTTCTGCC<br>CAG  | 68 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 2 des <i>pigr</i> (forward) ab Nukleotid 472           |
| <b>PIGRDELD3F</b>   | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGGACC<br>TGAGGGGCTCAGTGAC       | 62 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 3 des <i>pigr</i> (forward) ab Nukleotid 742           |
| <b>PIGRDELD3R</b>   | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGCCCA<br>GCCTGGCAGAGATAC        | 60 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 3 des <i>pigr</i> (reverse) ab Nukleotid 669           |
| <b>PIGRDELD4F</b>   | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGCAGT<br>ACGAGGGCCGCCTC         | 66 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 4 des <i>pigr</i> (forward) ab Nukleotid 1222          |
| <b>PIGRDELD4R</b>   | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGAGAG<br>CTTCCTGCCACCCC         | 62 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 4 des <i>pigr</i> (reverse) ab Nukleotid 1098          |
| <b>PIGRDEL3midR</b> | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGACAG<br>TTTTCCCCACTGCTCTG      | 64 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 3, 4 und 5 des <i>pigr</i> (reverse) ab Nukleotid 837  |
| <b>PIGRD5F</b>      | GCGCGCGCGCGCCCCGCGGCTCA<br>AGGTACCAGGGAATGTC      | 64 °C          | Sac II        | Deletion in Domäne 3, 4 und 5 des <i>pigr</i> (forward) ab Nukleotid 1390 |

**Tabelle17** : Oligonukleotide für die Deletionsmutagenese im hu-*pigr*

Oligonukleotide zur Amplifizierung von Inserts aus Vektoren oder aus Antibiotikakassetten heraus:

| Name        | Sequenz (5' → 3')          | T <sub>m</sub> |   |
|-------------|----------------------------|----------------|---|
| <b>M13</b>  | GACGTTGTAAACGACGGCCAG      | 73 °C          | Forward-Primer vom 5'-Ende der MCS des TOPO- und pGEM-Vektors |
| <b>RM13</b> | CACAGGAAACAGCTATGACCATG    | 72 °C          | Reverse-Primer vom 3'-Ende der MCS des TOPO- und pGEM-Vektors |
| <b>QE1b</b> | CATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAG | 64 °C          | Forward-Primer vom 5'-Ende der MCS des pQE-Vektors            |
| <b>QE2</b>  | GTTCTGAGGTCATTACTGGATC     | 65 °C          | Reverse-Primer vom 3'-Ende der MCS des pQE-Vektors            |
| <b>erm1</b> | CGAAATGATACACCAATCAGTGC    | 66 °C          | Reverse-Primer vom 5'-Ende der Erythromycinkassette           |
| <b>erm2</b> | GACGGTTCGTGTTTCGTGCTG      | 64 °C          | Forward-Primer vom 3'-Ende der Erythromycinkassette           |

**Tabelle 18:** Vektorprimer und Oligonukleotide aus Antibiotikakassetten

Oligonukleotide zur Detektion von Mykoplasmen-Kontaminationen

Die insgesamt 9 Oligonukleotide wurden dafür zu einem Primermix mit einer Konzentration von je 5 µM pro Oligonukleotid zusammengesetzt.

| Name            | Sequenz (5' → 3')    | T <sub>m</sub> |
|-----------------|----------------------|----------------|
| <b>Myco 9-A</b> | CGCCTGAGTAGTACGTTCGC | 64 °C          |
| <b>Myco 9-B</b> | CGCCTGAGTAGTACGTACGC | 64 °C          |
| <b>Myco 9-C</b> | TGCCTGAGTAGTACATTCGC | 60 °C          |
| <b>Myco 9-D</b> | CGCCTGGGTAGTACATTCGC | 64 °C          |
| <b>Myco 9-E</b> | CGCCTGAGTAGTATGCTCGC | 64 °C          |
| <b>Myco 9-F</b> | TGCCTGGGTAGTACATTCGC | 62 °C          |
| <b>Myco 3-A</b> | GCGGTGTGTACAAGACCCGA | 64 °C          |
| <b>Myco 3-B</b> | GCGGTGTGTACAAAACCCGA | 62 °C          |
| <b>Myco 3-C</b> | GCGGTGTGTACAAAACCCGA | 64 °C          |

**Tabelle 19:** Oligonukleotide für die Mycoplasmen-PCR

### 5.1.9 Vektoren und Plasmide

| Vektor / Plasmid | Selektionsbedingungen          | Referenz                       |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| pCR2.1           | Amp (100 µg/ml), Kan (50µg/ml) | Invitrogen                     |
| pGEM-T-Easy      | Amp (100 µg/ml)                | Promega                        |
| pJDC9            | Erm (5 µg/ml)                  | Morrisson <i>et al.</i> , 1984 |
| pQE30            | Amp (100 µg/ml)                | QIAGEN                         |
| pcDNA3.1 hplgR   | Amp (100 µg/ml)                | Piskurich <i>et al.</i> , 1993 |

**Tabelle 20:** Antibiotikaresistenzen der verwendeten Vektoren und Plasmide

### 5.1.10 Molekularbiologische Kits

|   |                    |
|---|--------------------|
| Abi Sequenzierung Prism™ Ready Reaction Kit           | Applied Biosystems |
| Dig Oligonucleotide 3'-End Labeling and Detection Kit | Roche              |
| pGEM®-T-Easy-Vektor System                            | Promega            |
| QIAGEN Purification Kits                              | Qiagen             |
| QIAGEN genomic DNA Kit                                | Qiagen             |
| QIAGEN Plasmid Midi Kit                               | Qiagen             |
| QIAquick Gel Extraction Kit                           | Qiagen             |
| QIAquick Nukleotide Removal Kit                       | Qiagen             |
| QIAquick PCR-Purification Kit                         | Qiagen             |
| RNeasy® Midi Kit                                      | Qiagen             |
| Peqlab Kits   | Peqlab             |
| E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit                              | Peqlab             |
| E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit                          | Peqlab             |
| E.Z.N.A.® Plasmid-Miniprep Kit II                     | Peqlab             |

### 5.1.11 DNA-Längenstandard

| DNA-Größenstandards          | Bandengrößen in bp   | Firma               |
|------------------------------|--|---------------------|
| $\lambda$ Hind III- Marker   | 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564   | New England Biolabs |
| Smart Ladder                 | 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200  | Eurogentech         |
| 1 KB-Ladder                  | 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 | MBI                 |
| HindIII- Marker DIG-markiert | 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564   | Roche               |
| RNA-Marker                   | 6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281                                | Promega             |
| RNA-Ladder                   | 9490, 7460, 4400, 2370, 1350, 240  | Gibco BRL           |

**Tabelle 21:** Bandengrößen der verwendeten DNA- und RNA- Längenstandards

## 5.2 Methoden zum Arbeiten mit DNA

### 5.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Die Isolierung der DNA aus *Streptococcus pneumoniae* erfolgte aus einer 200 ml THY-Kultur. Die Bakterien waren über Nacht bei 37 °C gewachsen und wurden anschließend für 10 min bei 10000 × g und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde in 6 ml TES aufgenommen und 1 ml Lysozym (5 mg/ml in TES) sowie 100 µl Mutanolysin (1 mg/ml in Tris, pH 7.5) dazugegeben. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Danach wurden 100 µl RNase (5 mg/ml in TES, DNase für 15 min bei 100 °C inaktiviert) zugegeben und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurde das Gemisch mit 50 µl Pronase (5 mg/ml in TES, für 30 min bei 37 °C vorinkubiert) versetzt und für weitere 15 min bei 37 °C belassen. Schließlich wurde eine Stunde mit 500 µl 10 % Sarcosyl (in 250 mM EDTA) inkubiert, bevor die Extraktion der Proteine mit Phenol/Chloroform erfolgte. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M-Natrium-Acetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropanol zur wässrigen Phase wurde die DNA gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation wurde die chromosomale DNA getrocknet und in 1 ml dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Alternativ konnte die chromosomale DNA mit Hilfe des QIAGEN genomic DNA Kits aus 100 ml Kultur isoliert werden.

### 5.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

1 ml einer über Nacht bei 37 °C und unter schütteln angezogenen Kultur wurde für die Isolierung der Plasmid DNA verwendet. Nach 3 min Zentrifugation bei 6800 × g wurde das Bakteriensediment in 200 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 4 mg/ml Lysozym) suspendiert. Zur Lyse der Zellwand wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % SDS) und 5 min Inkubation auf Eis. Schließlich wurden 300 µl 7,5 M Ammoniumacetat zugegeben, sofort invertiert und der Ansatz weitere 10 min auf Eis belassen. Danach wurde für 10 min bei 20800 × g zentrifugiert, um Membranen, chromosomale DNA und Proteine zu sedimentieren. 750 µl des Überstandes wurden mit 750 µl Isopropanol versetzt und zum Fällern der Plasmid-DNA 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 20800 × g. Die DNA wurde in 100 µl 70 % EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und 10 min bei 37 °C getrocknet. Abschließend erfolgte die Aufnahme der Plasmid-DNA in 40 µl dH<sub>2</sub>O, dem 1 µl RNase (5 mg/ml) zugesetzt waren. 4 µl davon wurden zur Konzentrationsbestimmung auf einem 0,8 %igen Agarosegel getestet.

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid DNA wurde eine 20 ml Kultur angezogen und über den Peqlab Plasmid Midi Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Aufgrund ihrer negativen Ladung können DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Ein Gel aus elektrisch neutraler Agarose formt ein komplexes Netzwerk aus Poren, durch das die DNA-Moleküle zum positiv geladenen Pol

wandern. Die Trennung der aufgetragenen DNA-Moleküle erfolgt in Abhängigkeit ihrer Größe.

Je nach der Größe der zu untersuchenden DNA wurden 0,8 – 2,0 %ige Gele verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte je nach Apparatur bei 80-120 Volt in TAE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Probenpuffer versehen.

Zum Nachweis der DNA im Agarosegel wurden die Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O) für 10 min inkubiert. EtBr bindet an DNA-Moleküle, indem es zwischen benachbarte Basenpaare interkaliert. Unter ultraviolettem Licht konnte die DNA sichtbar gemacht werden.

#### 5.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (Sambrook *et al.*, 1989)

Durch die photometrische Bestimmung der Absorption ultravioletter Strahlung konnte die Konzentration und Reinheit von RNA und DNA in einer Lösung festgestellt werden. Die Absorption wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. RNA und DNA haben bei einer optischen Dichte von 1 ( $OD_{260}=1$ ), und einer Schichtdicke der Quarzküvette von 10 mm eine Konzentration von 50 µg/ml.

Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm gibt eine Aussage über die Proteinkontaminationen in der Lösung. Bei einer reinen DNA- oder RNA-Probe beträgt das Verhältnis 1,8 – 1,95.

DNA-Konzentrationen konnten weiterhin aus dem Agarosegel abgeschätzt werden, wenn als Größenstandard der  $\lambda$ -HindIII- oder der Smart-Marker eingesetzt wurden.

#### 5.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem DNA-Gemisch wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und das gewünschte Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) oder des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (PqLab) gemäß den Protokollen der Hersteller.

#### 5.2.6 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Für die Spaltung von chromosomaler- oder Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA mit 1 Unit Enzym inkubiert. Als Puffer wurde der KGB-Puffer oder ein vom Hersteller empfohlener Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym angegebenen Temperatur für 1-2 Stunden. Zur Kontrolle wurde die geschnittene DNA in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

#### 5.2.7 Herstellung elektrokompenter Bakterien (Böttger, 1988)

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden 1000 ml LB-Medium mit 5 ml einer Vorkultur von *E. coli* (M15, DH5 $\alpha$  oder XL1-blue) angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 angezogen und die Bakterien 15 min bei 3000  $\times$  g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde zwei Mal in 1000 ml eiskaltem 1 mM HEPES gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 20 ml 10 % Glycerin. Die



Bakterien wurden in 2,5 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen, in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 5.2.8 Transformation von *E. coli* / Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988)

Bei der Elektroporation werden pro- und eukaryotische Zellmembranen durch Anlegen einer Spannung vorübergehend permeabilisiert. Durch die kurzzeitige Öffnung von Poren können DNA-Moleküle in die Zelle gelangen. Für die Transformation wurden 50 ng Plasmid-DNA mit 40 µl elektrokompenten *E. coli* Zellen gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Parametern: Spannung = 2.5 kV, Kapazität = 25 µF, Widerstand = 400 Ω. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach konnten die Bakterien auf LB-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

Bei Verwendung des TOPO-Cloning Kits bzw. pGEM-T-Easy Kits zur Klonierung von PCR-Produkten in den pCR2.1-Vektor wurde nach den Protokollen der Hersteller gearbeitet.

### 5.2.9 Transformation von *S. pneumoniae*

Da *S. pneumoniae* Stämme beim Wachstum in CpH8- Medium eine natürliche Kompetenz entwickeln, wurden die Stämme für Transformationen in diesem Medium angezogen. Die Kulturen wurden mit einer OD<sub>600</sub> von 0,03-0,04 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,1-0,15 (je nach verwendetem Stamm) wachsen gelassen. Jeweils 1,5 ml der Kulturen wurden abgenommen, mit 1,5 µg CSP, einem kompetenzstimulierenden Peptid, versetzt und bei 37 °C für 20 min weiterinkubiert. Nach genau 4 min auf Eis wurden 250 µl der Kulturen abgenommen und zu 0,5-2 µg Plasmid-DNA gegeben. Die Pneumokokken wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert und schließlich mit 1U DNase versetzt, um die nicht aufgenommene DNA zu zerstören. Der gesamte Transformationsansatz wurde nach 90 min Inkubation bei 37 °C auf zwei Blutagarplatten mit 1 µg/ml Erythromycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag konnten die Transformanten auf Blutagarplatten mit höherer Antibiotikakonzentration angezogen werden.

### 5.2.10 Pneumolysin-Test (Benton et al. 1997)

Zum Test auf Pneumolysin-Aktivität bei Pneumokokken wurde der Pneumolysin-Test nach Benton durchgeführt. Hierzu wurden 10 ml Schafblut bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und 3 × mit PBS gewaschen. Das Blut wurde jeweils in 20 ml PBS aufgenommen und der Überstand (Serum) nach der Zentrifugation verworfen. Schließlich wurde das Blutplasma mit Erythrozyten in 10 ml PBS aufgenommen und 1:50 in PBS verdünnt. Eine über Nacht gewachsene Pneumokokken-Kultur wurde für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand für den Pneumolysintest abgenommen. In den Vertiefungen einer 96-well-Platte wurden jeweils 100 µl Lysepuffer (10 mM DTT, 0,1 % BSA, pH 7,4) und 50 µl Pneumokokken-Überstand gemischt. Nach der Zugabe von 50 µl des gewaschenen Schafbluts folgte die

Inkubation für 30 min bei 37 °C. Durch Zentrifugation der Platten bei 1000 rpm für 10 min wurden die noch vorhandenen Erythrozyten sedimentiert und die Hämolyse konnte im Vergleich zur Negativkontrolle, die keinen Pneumokokken-Kulturüberstand enthielten, abgelesen werden.

### 5.2.11 Insertions-Duplikations-Mutagenese

Für die Insertions-Duplikations-Mutagenese chromosomaler Gene in *S. pneumoniae* wurde der pJDC9-Vektor eingesetzt, da er als Plasmid in Pneumokokken nicht stabil ist (Morrison *et al.*, 1984). Der pJDC9 besitzt keinen Replikationsursprung für Gram-positive Stämme und ist somit nicht in der Lage, autonom in *S. pneumoniae* zu replizieren.

Für die Mutagenese eines bestimmten Gens wurde zunächst ein internes Fragment dieses Gens in den pJDC9-Vektor kloniert. Durch Transformation des Vektors in *S. pneumoniae* und die folgende homologe Rekombination im Bereich des Vektorinserts kam es zur Integration des kompletten Vektors in das Chromosom. Der als Insert eingebrachte chromosomale Bereich lag anschließend zweimal auf dem Chromosom vor, zum einen aus der ursprünglichen chromosomalen DNA, zum anderen aus dem in das Chromosom integrierten Vektor.

Der Vektor enthält einen Erythromycin-Resistenzmarker, über den Mutanten selektioniert werden konnten. Für Sequenzierungsreaktionen aus dem Vektor heraus in das Insert hinein konnten die M13- und M13-reverse Primer verwendet werden.

### 5.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde angewendet, um DNA *in vitro* zu amplifizieren. Jeweils zwei gegensätzlich orientierte Oligonukleotide dienten als Primer für die Amplifizierung des zwischen ihnen liegenden DNA-Abschnittes. Durch mehrere sich wiederholende Zyklen, bestehend aus der Denaturierung der Doppelstrang-DNA, der Hybridisierung von Primern und DNA und der Synthese durch die Polymerase, wurde das DNA-Fragment amplifiziert. Als Polymerase wurde in der Regel die Biotherm-Star-Polymerase verwendet.

Die PCR wurde, wenn nicht anders angegeben, nach folgendem Reaktionsansatz und PCR-Programm durchgeführt:

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 5 µl                                    | 10 × Reaktionspuffer      |
| 5 µl                                    | 25 mM MgCl <sub>2</sub>   |
| 0,25 µl                                 | 10 mM dNTPs               |
| je 5 pM                                 | Oligonukleotid 5' und 3'  |
| 0,1 µl                                  | Biotherm-Polymerase       |
| 1 µl                                    | Template DNA (0,5 - 1 µg) |
| ad. 50 µl mit H <sub>2</sub> O (bidest) |                           |

PCR Programm:

|                         |       |        |      |
|-------------------------|-------|--------|------|
| Denaturierung           | 95 °C | 7 min  | 1 ×  |
| Denaturierung           | 95 °C | 30 sec | 30 × |
| Annealing               | X     | 1 min  |      |
| DNA-Synthese/Elongation | 72 °C | Y      |      |
| End-Synthese            | 72 °C | 4 min  | 1 ×  |

Die Annealingtemperatur (X) wurde in Abhängigkeit der Oligonukleotide etwa 5 °C unterhalb ihrer Schmelztemperatur gewählt. Die Dauer für die Elongation (Y) wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt (1 kb ≈ 1 min).

### 5.2.13 PCR-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA-Inserts in Vektoren oder Plasmid-DNA wurde die Methode der 'Taq Cycle' Sequenzierung mit 'Dye Deoxy' Terminatoren benutzt. Dieser nicht-radioaktiven Sequenziermethode liegt das Kettenabbruchverfahren nach Sanger zu Grunde (Sanger *et al.*, 1977). Bei der Methode dient einzelsträngige DNA als Matrize für eine DNA-Polymerase, die die Synthese des komplementären Strangs vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende katalysiert. Markiertes Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) wird zum Reaktionsgemisch gegeben, bei dessen Einbau es zum Kettenabbruch kommt.

Die Sequenzierung wurde im Rahmen einer PCR durchgeführt, bei der in einem Ansatz DNA, Polymerase, ein Primer und die fluoreszenzmarkierten ddNTPs und dNTPs gemischt wurden. Die durch den Kettenabbruch beim Einbau eines ddNTPs entstandenen unterschiedlich großen DNA-Fragmente wurden in hochauflösenden Sequenziergelen aufgetrennt. Durch Laser-Detektion der ddNTPs und Digitalisierung der Daten konnte die Abfolge der Basen bestimmt werden. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte an der GBF in einem Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems.

Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt:

- 1 µl DNA (500 ng)
- 1 µl Oligo (15 pmol)
- 2 µl Premix
- 2 µl Sequenzierpuffer
- auf 10 µl mit Milli Q-Wasser auffüllen.

PCR-Programm:

|                        |       |        |        |
|------------------------|-------|--------|--------|
| Denaturierung          | 94 °C | 3 min  | 1 ×    |
| Denaturierung          | 94 °C | 30 sec | } 25 × |
| Annealing              | X     | 15 sec |        |
| DNA-Synthese/Extension | 60 °C | 4 min  |        |

Die Annealingtemperatur (X) wurde 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt.

Nach der PCR wurde die DNA mit Hilfe des QIAGEN Dye-Ex-Kits aufgereinigt und in der Speed-Vac getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI Sequenzer.

#### 5.2.14 Site-directed-Mutagenesis (Ho *et al.*, 1989)

Zur Einführung einer oder mehrerer Punktmutationen in ein Gen durch PCR-Amplifikation wurde der QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für den Bereich der Sequenz, in dem die Punktmutationen eingeführt werden sollten, wurden Oligonukleotide synthetisiert, die bis zu 9 Nukleotidaustausche enthielten. Die Primer waren so gewählt, dass sie zwischen 25 und 45 Basen lang waren und eine Schmelztemperatur von 78 °C hatten. Die Mutationen waren in der Mitte der Primer gesetzt und besaßen zu beiden Seiten 15-20 weitere Basen. Die Oligonukleotide waren über Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereinigt.

Als PCR-Template wurde ein Plasmid mit der gesamten, ursprünglichen DNA des zu mutierenden Gens verwendet. Das Plasmid wurde durch inverse PCR von den Primern aus amplifiziert, die die Punktmutationen in den gewählten Bereichen einfügten. Dabei wurde folgender PCR-Ansatz gewählt:

|   |                      |
|---|----------------------|
| 5 µl  | 10 × Reaktionspuffer |
| 40 ng   | dsDNA template       |
| 125 ng  | Primer 1             |
| 125 ng  | Primer 2             |
| 1 µl  | dNTP mix             |
| ddH <sub>2</sub> O auf 50 µl                            |                      |
| Zugabe von 1 µl Pfu Turbo DNA Polymerase (2,5 Units/µl) |                      |

PCR-Protokoll:

| Temperatur | Zeit        | Zyklen |
|------------|-------------|--------|
| 95 °C      | 30 Sekunden | 1      |
| 95 °C      | 30 Sekunden | 18     |
| 55 °C      | 1 Minute    |        |
| 68 °C      | 8 Minuten   |        |

Zur Kontrolle der Reaktion wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Um die ursprüngliche Plasmid-DNA zu zerstören, wurde der gesamte Ansatz mit der Endonuklease *DpnI* für 1 h bei 37 °C inkubiert und dadurch die methylierte DNA verdaut. Die mutierte DNA wurde mittels Hitzeschock in kompetente XL1-Blue Bakterien transformiert und zur Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten über Nacht bei 37 °C kultiviert. Durch DNA-Sequenzierung wurde die Mutagenese überprüft.

### 5.2.15 Klonierung in Topo- oder pGEM- Vektor

Der TOPO™ TA-Cloning® Kit und der pGEM-T-Easy Cloning Kit wurden für direkte Klonierungen von PCR-Produkten verwendet. Die Vektoren besitzen 3'-Thymidin (T)-Überhänge für eine direkte Ligation mit *Taq*-amplifizierten PCR-Produkten, da die *Taq*-Polymerase ein einzelnes Deoxyadenosin (A) an das 3'-Ende eines PCR-Produkts anfügt. Die Ligation des Vektors mit einem PCR-Produkt ist somit sehr effizient. Der Ligationsansatz wurde anschließend in elektrokompetente Bakterien transformiert.

Die Klonierungsreaktionen wurden jeweils nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei jeweils 20 ng des PCR-Produkts verwendet wurden. Bei der TOPO-Klonierung waren die kompetenten One Shot™ Bakterien in dem Kit enthalten, während für die Klonierung in den pGEM-Vektor elektrokompetente XL1-blue für die Transformation verwendet wurden. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte auf LB-Agar unter Zugabe von Ampicillin und Kanamycin. Außerdem konnte mittels blau-weiss-Selektion festgestellt werden, welche Kolonien das klonierte DNA-Fragment in dem Vektor enthielten. Dazu wurden die Agarplatten vor dem Ausstreichen der Bakterien mit 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl 40 mg/ml X-Gal bestrichen und zum Eindiffundieren der Lösungen 15 min bei 37°C inkubiert.

### 5.2.16 Ligationen

Bei der Ligation wurden durch eine enzymatische Reaktion doppelsträngige Nukleinsäuren durch Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 3'-OH- und 5'-Phosphatenden miteinander verbunden. Bei Ligationen von kohäsiven Enden wurde das Insert in 3-fachem molaren Überschuss zum Vektor gegeben. Bei glatten Enden wurde das Insert in 5-fachem Überschuss eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit 100 ng Vektor-DNA in einem Reaktions-Volumen von 10 µl mit 1 U T4-Ligase in 1 × Ligationspuffer für mindestens 16 h bei 12 °C.

### 5.2.17 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Proben, aus denen Proteine entfernt werden sollten, wurden auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol vermischt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 20000 × g wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 100 µl Phenol/Chloroform versehen. Die Lösung wurde wie zuvor zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die gefällten Proteine sammelten sich bei den Zentrifugationsschritten als Bande zwischen der wässrigen und der organischen Phase und wurden durch vorsichtiges Abnehmen der wässrigen Phase abgetrennt. Bei sehr hohen Proteinkonzentrationen konnte es erforderlich sein die Phenolisierung zu wiederholen. Die DNA wurde durch eine Ethanolfällung aus der Lösung gewonnen.

### 5.2.18 Phenol-Diethylether Extraktion

Diese Methode wurde bei der Aufreinigung von Ligationsansätzen angewendet. Die Lösungen wurden zunächst mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform vermischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 20000 × g und der Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden noch

einmal 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zu der organischen Phase gegeben. Diese wurden schließlich mit den ersten 100  $\mu\text{l}$  vereinigt und mit 150  $\mu\text{l}$  Diethylether vermischt, wodurch Reste von Phenol aus der Lösung entfernt wurden. Nach erneuter Zentrifugation bei  $20000 \times g$  wurde der größte Teil des Diethylethers abgenommen. Der Rest dampfte in kurzer Zeit ab, so dass die DNA aus der Lösung mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2 Volumen absolutem EtOH gefällt werden konnte.

#### 5.2.19 Dephosphorylierung

Die alkalische Phosphatase wurde eingesetzt, um endständige 5'-Phosphatgruppen in doppelsträngigen DNA-Molekülen zu entfernen. Die Reaktion wurde mit linearisierten Klonierungsvektoren durchgeführt um Religationen zu verhindern und den Einbau der zu klonierenden DNA-Fragmente zu begünstigen.

Die Reaktion wurde in  $10 \times$  KGB-Puffer unter Zugabe von 0,5 Units Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA durchgeführt. Die Ansätze wurden 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und danach das Enzym für 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  inaktiviert.

#### 5.2.20 Ethanol-Fällung

Für die Fällung von DNA wurde zu einer Lösung, aus der die Nukleinsäuren gefällt werden sollten, 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 2,5 Volumen absolutes EtOH gegeben und für einige Stunden oder über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Danach wurde die Lösung für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $20800 \times g$  zentrifugiert, die DNA mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Das trockene DNA-Sediment konnte in einem angemessenen Volumen  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgenommen werden.

#### 5.2.21 Digoxigenin (DIG)-Markierung mittels PCR

Zur Herstellung nicht radioaktiver DNA-Sonden wurden DNA-Fragmente mit Digoxigenin markiert, um sie zur Identifizierung von homologen Sequenzen in der DNA-DNA-Hybridisierung einsetzen zu können. Die Markierung der DNA erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP während einer PCR. Zur Detektion dieser markierten Fragmente wurde ein an alkalische Phosphatase gekoppelter polyklonaler Schaf-anti-DIG-Antikörper verwendet, der mit dem Substrat CSPD reagierte. Durch enzymatische Dephosphorylierung wurde eine Lichtemission ausgelöst, die auf einem Röntgenfilmen als positives Signal sichtbar gemacht werden konnte.

### 5.3 Methoden zum Arbeiten mit RNA

#### 5.3.1 Isolierung der RNA aus Pneumokokken

Die Isolierung der RNA erfolgte aus 15 ml Pneumokokkenkultur einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 bis 0,5 (entspricht etwa  $5 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{10}$  Bakterien) mit dem RNeasy Midi-Kit nach Angaben des Herstellers. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die RNA bei 260 nm gemessen. Zur Qualitätskontrolle wurde je 1  $\mu\text{g}$  auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Intakte, nicht degradierte RNA zeigte nach dem Färben mit

Ethidiumbromid drei klar abgegrenzte Banden, die der 5S, 16S und 23S rRNA entsprechen.

### 5.3.2 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolierung der RNA aus Epithel- und Endothelzellen wurden diese in Kulturschalen angezogen, bis sie nahezu konfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden mit PBS/EDTA abgelöst und je  $1 \times 10^7$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und mit 750  $\mu$ l TriFast FL (Peglab) versetzt. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen lysiert und die Suspension gegebenenfalls bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur Isolierung der RNA wurde pro 1 ml Homogenat 0,1 ml BCP (1-Bromo-3-Chloro-Propan) zugesetzt und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach 3-10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 5 min bei  $12000 \times g$  zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 15 min Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  wurde erneut für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $12000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Sediment 2  $\times$  mit 75 % Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung konnte die RNA in 50  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst werden.

### 5.3.3 Isolierung der mRNA aus der gesamt-RNA

Die Aufreinigung der mRNA aus der gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Oligotex™mRNA-Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die mRNA wurde über Säulen aufgereinigt und mit insgesamt 50  $\mu$ l Elutionspuffer eluiert. Die mRNA-Konzentration wurde über die Messung der optischen Dichte bestimmt, und für den folgenden Northernblot jeweils 100 ng eingesetzt.

### 5.3.4 Northern-Blot

Zum Nachweis einer spezifischen mRNA durch eine DNA-Sonde wurden Northern-Blots angefertigt. Die RNA wurde zunächst durch ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Zum Schutz der RNA vor RNasen wurden alle verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und alle Plastikmaterialien vor Gebrauch mit RNase-Ex-Spray behandelt.

Da die RNA denaturiert vorliegen musste, um sie nach ihrer Größe auftrennen zu können, wurden Formaldehydagarosegele verwendet. Formaldehyd reagiert mit den Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin und verhindert so die Basenpaarungen. Weiterhin wurde den RNA-Proben Formamid zugesetzt, um Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und so den Angriff des Formaldehyds an den Basen zu ermöglichen. Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 1 g Agarose in 87 ml DEPC- $\text{dH}_2\text{O}$  durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf  $60^\circ\text{C}$  wurden 10 ml  $10 \times$  MOPS-Puffer und 3 ml Formaldehyd (37 %) dazu gegeben, vorsichtig gemischt und das Gel gegossen.

Für einen Northern-Blot wurden 2  $\mu$ g der mRNA mit 3  $\mu$ l  $3 \times$  Probenpuffer versehen, auf 9  $\mu$ l mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt und für 10 min bei  $60^\circ\text{C}$  denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für etwa 1,5 Stunden. Nach der Elektrophorese

wurde das Gel für 45 min in  $10 \times$  SSC äquilibriert. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot mit  $10 \times$  SSC als Transferpuffer. Der Blot war aufgebaut aus drei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier, auf die das Gel und die äquilibrierte Membran gelegt wurden. Es folgten zwei weitere Lagen Whatmanpapier und eine etwa 10 cm hohe Schicht trockenes Filterpapier, das mit einem Gewicht von 1 kg beschwert wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 10 min in  $2 \times$  SSC gewaschen und zur Fixierung der RNA für 15 min bei  $120^\circ\text{C}$  gebacken.

### 5.3.5 Spezifischer Nachweis von RNA durch DIG-markierte Sonden

Die Hybridisierung der Membran mit der DIG-markierten Sonde erfolgte in einem Hybridisierungssofen bei  $42^\circ\text{C}$ . Die Membran wurde mit vorgewärmten Hybridisierungspuffer für mindestens 2 Stunden bei  $42^\circ\text{C}$  prähybridisiert. 100 ng der Sonden wurden zusammen mit 100  $\mu\text{l}$  Heringsperm-DNA durch 10 minütiges Aufkochen denaturiert und zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für  $2 \times 5$  Minuten bei Raumtemperatur in  $2 \times$  SSC mit 0,1 % SDS und für  $2 \times 15$  Minuten bei  $65^\circ\text{C}$  in  $0,1 \times$  SSC mit 0,1 % SDS gewaschen. Die Detektion der gebundenen Sonde wurde durch Bindung spezifischer Anti-Digoxigenin-Antikörper erreicht. Der Nachweis erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion, bei der CDP-Star als Substrat für die alkalische Phosphatase diente, die an den DIG-Antikörper gekoppelt war. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

### 5.3.6 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Die aus den Zellen extrahierte gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die wiederum als Ausgangsmaterial für nachfolgende PCR-Reaktionen diente. Vor der reversen Transkription wurde ein DNase-Verdau der RNA durchgeführt, bei der die RNA für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit DNase in  $1 \times$  DNase-Reaktionspuffer (Promega) inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Stop-Lösung (Promega) und Erhitzen auf  $65^\circ\text{C}$  unterbrochen. Die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MLV) von der Firma Promega durchgeführt. Als Template wurden 5  $\mu\text{g}$  einer RNA-Präparation verwendet und zunächst für 10 min mit Oligo-(dT)-Primern (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Nach dem Abkühlen auf Eis für 2 min wurden dNTP-Mix (10 mM), RNasin (40 U/ml), DTT (100 mM) und 5 x Puffer zu der Reaktion gegeben und 2 min bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert. Durch Zugabe von 200 U reverser Transkriptase wurde die Reaktion gestartet. Nach 30 min Inkubation bei  $42^\circ\text{C}$  wurde die Transkription durch 5 min Inkubation bei  $90^\circ\text{C}$  mit 40  $\mu\text{l}$  TE (10/1) beendet.

### 5.3.7 PCR-Amplifikation von cDNA

Zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  der durch Reverse Transkription hergestellten cDNA als Template eingesetzt. Die PCR erfolgte mit der Biotherm-Star-Polymerase nach dem beschriebenen Protokoll. Die Kontrolle der PCR erfolgte elektrophoretisch.



## 5.4 Methoden für das Arbeiten mit Proteinen

### 5.4.1 Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Herstellung von Lysaten aus *E. coli* wurden die Bakterien mittels French Press mechanisch aufgeschlossen. Die Zellyse beruht bei dieser Methode auf der Wirkung von hohem Druck und von Scherkräften auf die Bakterien. Die zu lysierenden Bakterien wurden mit PBS gewaschen und dann in einem kleinen Volumen (5-10 ml) PBS aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in einen vorgekühlten Kolben gegeben und mit einem Stempel verschlossen. Über den Stempel konnte der Druck aus der Apparatur auf die Zellen übertragen werden. Nach Erreichen eines Drucks von 1000 psi in der Kammer wurde am unteren Rand des Kolbens langsam ein Ventil geöffnet, durch das die aufgeschlossenen Bakterien entweichen konnten. Der Ablauf wurde zwei bis drei Mal wiederholt, um eine vollständige Lyse der Zellen zu bewirken.

Zur Herstellung kleiner Mengen Lysat von *S. pneumoniae* oder *E. coli* wurden 1,5 ml einer Bakterienkultur bei  $1700 \times g$  für 10 min zentrifugiert, das Bakteriensediment in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und mit der gleichen Menge Proteinprobenpuffer versetzt. Die Suspension wurde für 10 min aufgekocht. Anschließend wurden 10 - 20  $\mu$ l des Lysats auf ein SDS-Gel aufgetragen. Diese Menge entspricht einer Konzentration von  $7,5 \times 10^6$  Bakterien.

### 5.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die auf der Grundlage basiert, dass Moleküle mit Nettoladung im elektrischen Feld wandern. Die Wandergeschwindigkeit der Moleküle im Gel hängt von ihrer Größe im Vergleich zu der Porengröße des Gels ab. Durch verschiedene Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid konnte die Porengröße bestimmt werden.

Unter denaturierenden Bedingungen können Proteine auf der Basis ihrer Masse aufgetrennt werden. Die Proteine werden in einer SDS-Lösung aufgenommen, die nahezu alle nicht-kovalenten Bindungen nativer Proteine zerstört. Mercaptoethanol wird zugesetzt, um Disulfidbrücken zu spalten. Anionen des SDS binden an die Proteine, wodurch das denaturierte Protein eine negative Ladung erhält, die ungefähr proportional zu seiner molekularen Masse ist. Der SDS-Protein-Komplex kann so elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Bei der SDS-PAGE wird ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel verwendet, das aus einem niederprozentigen Sammelgel, in dem die Proben aufkonzentriert werden, und einem höherprozentigen Trenngel besteht, in dem die einzelnen Proteine aufgetrennt werden.

## Bestandteile der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

|                               | Trenngel |        |        | Sammelgel |
|-------------------------------|----------|--------|--------|-----------|
|                               | 10 %     | 12 %   | 16 %   | 4 %       |
| Dest. H <sub>2</sub> O        | 3,0 ml   | 2,5 ml | 1,5 ml | 2,5 ml    |
| Tris-Cl 1,5 M, pH 8,8         | 1,9 ml   | 1,9 ml | 1,9 ml | 1,0 ml    |
| Tris-Cl 0,5 M, pH 6,8         |          |        |        |           |
| 10 % SDS                      | 75 µl    | 75 µl  | 75 µl  | 40 µl     |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) | 2,5 ml   | 3,0 ml | 4,0 ml | 0,5 ml    |
| APS (10 %)                    | 40 µl    | 40 µl  | 40 µl  | 20 µl     |
| TEMED                         | 4 µl     | 4 µl   | 4 µl   | 4 µl      |

Als Größenstandard diente ein vorgefärbter Molekulargewichtstandard (Peqlab). Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 1 Stunde. Danach konnte das Trenngel direkt für eine Coomassiefärbung oder einen Immunblot verwendet werden.

## 5.4.3 Protein Größenstandard

| peqGOLD Prestained Protein-Marker (Peqlab) |                        |
|--|------------------------|
| Protein                                    | Molekulargewicht (kDa) |
| β-Galaktosidase                            | 121,6                  |
| Bovines Serum-Albumin                      | 81,4                   |
| Ovalbumin                                  | 46,8                   |
| Karboanhydrase                             | 32,0                   |
| β-Laktoglobulin                            | 24,5                   |
| Lysozym                                    | 20,4                   |

## 5.4.4 Coomassie-Färbung

Polypeptide, die durch SDS-PAGE aufgetrennt waren, konnten mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt werden. Gele wurden nach der Elektrophorese für 1-2 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend in ein Entfärbebad überführt. Der Entfärber entfernte den Farbstoff aus dem Gel, nicht aber aus den Proteinen, die dadurch sichtbar wurden. Vor der Trocknung der Gele wurden diese in Wasser aufbewahrt. Die gefärbten Gele wurden in einem Geltrockner (Bio-Rad) zwischen zwei Zellophanfolien konserviert.

## 5.4.5 Immunblot

Zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe von Antikörpern wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Semidry-Blotting-Apparatur auf eine mit Methanol aktivierte Nylon-Membran (PVDF) oder Nitrozellulosemembran übertragen. Gel und Filter lagen dabei zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Papier,

das zuvor in Transferpuffer getränkt worden war. Der Transfer erfolgte zwischen zwei Graphit-Platten-Elektroden, wobei die Membran auf der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite liegen musste. Membran und Gel waren zuvor etwa 15 Minuten in Blotting Puffer äquilibriert worden.

Nach dem Transfer der Proteine wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit 10 % Magermilch in PBS für mindestens 1 Stunde abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen Primärantikörper für mindestens 2 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS konnte der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper zugegeben und für weitere 60 min inkubiert werden. Nach erneutem Waschen wurde die enzymatische Reaktion in 10 ml PBS durch Zusatz von 12  $\mu$ l  $H_2O_2$  und 50  $\mu$ l Chloronaphthol (0,2 g/ml) ausgelöst und positive Banden anhand einer Farbreaktion detektiert.

Für den Blot-overlay-Assay wurde die Membran nach dem Absättigen mit dem Protein für 2-3 Stunden inkubiert, das an die geblocteten Proteine binden sollte. Anschließend folgte die Inkubation mit einem für das Proteine spezifischen Primärantikörper und mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von  $H_2O_2$  und Chloronaphthol ausgelöst.

#### 5.4.6 Dot-spot-Analyse

Zur Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Interaktion unter nativen Bedingungen wurden rekombinante und gereinigte Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen (1  $\mu$ g –10  $\mu$ g) auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Durch Anlegen eines Vakuums an eine spezielle Spot-Apparatur konnten die gelösten Proteine auf die zuvor in PBS getränkte Membran immobilisiert werden. Anschließend wurde die Membran getrocknet und in PBS mit 10 % Magermilch für mindestens 1 h abgesättigt. Wie im Blot overlay Assay konnte die Bindung anderer Proteine untersucht und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden.

#### 5.4.7 Spot Membran Analyse

Zur Identifizierung des SpsA-Bindungsmotivs im humanen polymeren Immunglobulin Rezeptor (plgR) wurde die gesamte plgR-Sequenz in jeweils 15 Aminosäuren lange synthetische Peptide unterteilt und diese auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Peptide wiesen dabei eine Sequenzverschiebung von je 3 Aminosäuren auf (Frank, 1992 und 1995).

Zur Untersuchung der Bindung von SpsA an die Membran wurde diese mit Ethanol befeuchtet und dreimal mit TBS gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht in 5 ml Absättigungspuffer bestehend aus 1 ml Genosyspuffer, 0,5 % Saccharose und 4 ml T-TBS. Die Membran wurde in 10 ml T-TBS gewaschen und für etwa 3 h mit Protein in 5 ml Absättigungspuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen für  $3 \times 10$  min mit jeweils 10 ml T-TBS wurde der Filter für 3 h mit dem für das verwendete Protein spezifischen Primärantikörper in 5 ml Absättigungspuffer inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit T-TBS und die Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper in 5 ml Absättigungspuffer für 1,5 h. Anschließend wurde der Filter einige Male mit T-TBS gewaschen und mit  $H_2O_2$  und Chloronaphthol (Farbreaktion) oder mit dem ECL-Detektionskit (Chemilumineszenz) entwickelt.

Um die Membran wiederverwenden zu können, wurde sie nach folgendem Protokoll gewaschen. Zunächst wurde die Membran 3 × mit dH<sub>2</sub>O und einmal mit DMF für jeweils 10 min gewaschen. Es folgte eine Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschallstab für etwa 15 min in DMF. Die Lösung wurde dabei auf Eis gehalten, um eine zu starke Erwärmung der Lösung zu vermeiden. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit DMF und drei weitere mit dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Membran 3 × 10 min mit Puffer A gewaschen, wobei sie jeweils 5 min in der Lösung geschwenkt und 5 min mit dem Ultraschallstab behandelt wurde. Nachdem die Membran drei Mal für je 5 min in Puffer B geschwenkt und mit 95 % Ethanol gewaschen worden war, konnte sie erneut abgesättigt oder nach Trocknung bei -20 °C aufbewahrt werden.

#### 5.4.8 Expression von Proteinen in *E. coli*

Für eine *E. coli*- Expressionskultur wurden 250 ml LB, supplementiert mit den für die Selektion des entsprechenden rekombinanten Stamms erforderlichen Antibiotika, mit 5 ml einer Übernackkultur des Stamms beimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,8 angezogen. Am nächsten Morgen wurde zu der Flüssigkultur noch einmal die gleiche Menge an Medium gegeben und mit 1 mM IPTG (β-D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid) versetzt. Nach weiteren 4-5 Stunden Inkubation bei 28 °C wurde die Kultur für 15 min bei 3500 × zentrifugiert.

#### 5.4.9 Aufreinigung von Histag-Fusionsproteinen über Ni-NTA-Agarose

An die aufzureinigenden rekombinanten Proteine waren sechs Histidinreste gekoppelt, die an Ni-NTA-Agarose binden und dadurch von den restlichen Proteinen getrennt werden können. Die Elution der Proteine von der Ni-NTA-Agarose erfolgte mit Hilfe von 250 mM Imidazol, dessen Struktur ähnlich der der Histidine ist und so die gekoppelten Proteine durch einen Konzentrationsüberschuss verdrängt. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen.

Das nach der Expression von Proteinen gewonnene Bakteriensediment wurde in 10 ml Lysispuffer aufgenommen und durch French Press aufgeschlossen. Das Lysat wurde erneut bei 10000 × g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand für die Aufreinigung der Fusionsproteine auf die NiNTA-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Waschpuffer, der 20 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol, wobei das Eluat fraktioniert aufgefangen wurde. Die Qualität der Aufreinigung wurde nach SDS-PAGE durch eine Coomassiefärbung überprüft.

Die Aufreinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mit 4 M Harnstoff wobei die Elution der Proteine über einen pH-Shift von pH 8 auf pH 4,5 erfolgt.

#### 5.4.10 IgG-Aufreinigung

Zur Isolierung von IgG aus Serum wurde die Probe über Protein A-Sepharose aufgereinigt. 0,5 g der Protein A-Sepharose wurden in 20 ml dH<sub>2</sub>O aufgenommen und zum Aufquellen 15 min unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Füllen der Säule wurde sie für 15 min mit PBS gespült und 5 ml des Serums darauf gegeben. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Die Elution der IgG's erfolgte

mit 0,1 M Glycin/HCl (pH 3,0). Das Eluat wurde mit 1 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert, das Säulenbett mit 2 M Harnstoff gewaschen und mit PBS equilibriert. Das Säulenmaterial konnte bei 4 °C gelagert und wiederverwendet werden. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte des Eluats bei 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>280</sub> von 1 einer Konzentration von 0,8 mg IgG pro ml.

#### 5.4.11 Dialyse

Die Dialyse ist ein auf Diffusionsvorgängen beruhendes Verfahren, bei dem niedermolekulare Moleküle aus einer wässrigen Lösung hochmolekularer Substanzen herausgetrennt werden.

Die Lösungen wurden für die Dialyse in einen entsprechend großen Dialyseschlauch überführt, durch dessen Membran die Proteine nicht hindurchtreten konnten. Salze und andere kleinere Moleküle hingegen passierten die Membran. Der Schlauch wurde in 4-5 Liter des Puffers überführt, gegen den dialysiert werden sollte. Unter Rühren des Puffers wurde für 16 Stunden bei 4 °C dialysiert.

#### 5.4.12 Proteinsequenzanalyse

Für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen wurden diese über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Lokalisation der gewünschten Proteinbande konnte diese entweder durch reversibles Anfärben mit Ponceau-S oder durch Immunblot Analyse von benachbarten Proteinbanden detektiert werden. Die N-terminale Sequenzanalyse der Proteinbande erfolgte in der Abteilung „Molekulare Strukturforschung“ an der GBF.

### 5.5 Methoden für das Arbeiten mit Zelllinien

#### 5.5.1 Zelllinien und Medien

##### HEp-2 (ATCC CCL-23)

Die humane, adhärent wachsende Zelllinie wurde aus einem humanen Epidermiskarzinom des Kehlkopfes entnommen und enthält einen HeLa Marker (Moore, A.E., Sabachewsky, L., Toolan, H. W., 1952). HEp-2 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin kultiviert und in maximal 15 Passagen subkultiviert.

##### A549 (ATCC CCL-185)

Diese humane Zelllinie wurde aus einem explantierten Lungentumor 1972 etabliert (Giard, D. J. *et al.*, 1972). Die Zellen entstammen Pneumozyten vom Typ II. Die adhärent wachsenden Zellen wurden im gleichen Medium wie HEp-2 Zellen kultiviert und ebenfalls maximal 15 Passagen subkultiviert.

**Calu-3 (ATCC HTB-55)**

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane adhärenz Epithelzellen aus der Lunge, speziell aus einem Adenokarzinom (Fogh *et al.*, 1975). Sie wurde in Eagle's MEM (minimum essential medium) mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 % Natrium Pyruvat, 0,1 mM non-essential amino acids, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte über maximal 15 Passagen.

**MDCK (ATCC CCL-34)**

Diese Zellen sind adhärenz Epithelzellen, die 1958 aus der Niere eines normalen erwachsenen weiblichen Cocker Spaniel (Hund) entnommen wurden (S.H. Madin und N.B. Darby, September 1958). Sie wurden im gleichen Medium wie Calu-3 Zellen, jedoch ohne Zugabe von Natriumpyruvat und non-essential amino acids über maximal 15 Passagen kultiviert.

**MDCK-hplgR**

Bei den MDCK-hplgR-Zellen handelt es sich um stabil transfizierte MDCK-Zellen, die den humanen plgR (polymeren Immunglobulin-Rezeptor) exprimieren. Sie wurden transfiziert mit der cDNA des hplgR im pCB6 Vektor. Die Kultivierung erfolgte wie die der MDCK-Zellen.

**HBMEC**

Diese humanen Hirnendothelzellen (human brain-derived microvascular endothelial cells) wurden bei einer Gehirnbioptie einer an Epilepsie erkrankten Frau entnommen. Um eine unsterbliche Zelllinie zu erhalten, wurden diese mit dem SV 40-large T-Antigen transfiziert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS, 10 % NU-Serum IV, 2 mM Glutamin, 0,1 mM non-essential amino acids, 1 % MEM-Vitamine, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin verwendet. Die Subkultivierung erfolgte über maximal 10 Passagen.

Die angegebenen Zellkultur-Medien und Zusätze wurden von den Firmen Gibco oder PAA bezogen.

**5.5.2 Kultivierung der Zelllinien**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Plastikkulturflaschen oder in Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm bei 37 °C, ca. 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Alle in der Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. PBS-EDTA wurde bei Raumtemperatur eingesetzt. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 100 × g für 5 bis 10 Minuten durchgeführt. Alle in der Zellkultur verwendeten Substanzen waren auf Mycoplasmenkontaminationen überprüft.

Zum Splitten von konfluent gewachsenen Zellen auf neue Kulturschalen oder zum Aussäen der Zellen für Infektionsversuche wurden diese mit PBS/EDTA (1 × PBS, 2 mM EDTA, pH 7,5) von dem Boden der Kulturflasche abgelöst. MDCK und HUVEC wurden zum Ablösen mit Trypsin-EDTA behandelt. Nach 5-10 min Inkubation bei 37 °C (für MDCK bis zu 15 min) wurden die Zellen abgenommen und bei 100 × g für 5 min zentrifugiert werden. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und erneut in Kulturflaschen ausgesät oder zum Aussäen mit definierter Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Diese Zellen wurden dann je nach Versuchsansatz in 24-well-Platten, 4-well-Platten oder Transwells ausgesät.

### 5.5.3 Kultivierung der Zellen im Transwellsystem

Für Studien an polarisierten Zellen, die sowohl von der apikalen als auch von der basalen Seite infiziert werden konnten, wurden Calu-3 und MDCK-hplgR Zellen in bzw. auf den Filterinserts von Transwell®-Kammern mit einer Porengröße von 3 µm (Costar Transwell® Polycarbonatmembran Ø 6,5 mm) kultiviert. Die Zellen wurden mittels PBS/EDTA von dem Boden der Kulturflaschen gelöst, die Zellzahl pro ml bestimmt und jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen auf die Filter ausgesät. Dabei konnte das Filterinsert sowohl innen, als auch von unten mit Zellen bestückt werden. Um die Zellen von „unten“ an die Membran zu bringen, wurden die Filterinserts aus der 24-well-Platte genommen und umgedreht auf eine sterile Unterlage gestellt. Der Filter wurde mit einem sterilen Plastikring umschlossen, um die Zellsuspension auf die Membran aufzutropfen zu können. Nach etwa 16 Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank hatten sich die Zellen abgesetzt und der Transwelleinsatz konnte wieder in die Vertiefung der 24-well-Platte gehängt werden. Die Zellen wurden ausschließlich im unteren well mit Medium versehen und 8 Tage bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei alle zwei Tage das Medium ersetzt wurde.

Vor einer Infektion wurde die Konfluenz des Zelllayers durch Messung des transepithelialen Widerstandes (Millicell®-ERS von Millipore) bestimmt. Für Calu-3 sollte der Widerstand bei etwa 150 Ωcm<sup>2</sup> liegen. Für MDCK-hplgR Zellen etwas niedriger bei etwa 110 Ωcm<sup>2</sup>.

Die Infektion eines Transwells erfolgte in der Regel durch Zugabe der Bakterien ( $5 \times 10^6$  Bakterien) in die obere Kammer des Zwei-Kammer-Systems. Die Transwells wurden, wenn nicht anders angegeben, für 1-6 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 Stunden wurden nicht adhärenente Bakterien durch Mediumwechsel entfernt und die Transwells weiter inkubiert.

### 5.5.4 Konservierung der Zelllinien

Zellen können durch Lagerung in flüssigem Stickstoff über Jahre hinweg konserviert werden. Die Zellen wurden als Suspension im Kulturmedium unter Zusatz von 10 % FCS und 10 % DMSO eingefroren. Zunächst wurden die Röhrchen in einem mit Isopropanol gefülltem Einfriercontainer (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Conainer) bei – 80°C gelagert, um eine konstante Verringerung der Temperatur um 1 °C pro Minute zu ermöglichen und somit die Bildung von Kristallen zu vermeiden. Nach etwa 12-16 Stunden wurden die Röhrchen in den flüssigem Stickstoff überführt.

### 5.5.5 Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese in einem 37°C Wasserbad nahezu vollständig aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Sofort wurde 1 ml vorgewärmtes Kultivierungsmedium zugegeben und gemischt, um die Konzentration des zum Einfrieren verwendeten DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei  $100 \times g$  zentrifugiert und die Zellen schließlich in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert.

### 5.5.6 Gewinnung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Proteinen aus den verwendeten Epithel- und Endothelzellen wurden die Zellen in Kulturflaschen bis zu einem nahezu konfluenten Monolayer angezogen. Die Zellen wurden mit PBS/EDTA bzw. Trypsin/EDTA von dem Boden der Kulturflaschen abgelöst, 5 min bei  $100 \times g$  zentrifugiert und das Zellsediment in Proteinprobenpuffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 5.5.7 Test auf Mycoplasmenkontaminationen

Mycoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryoten. Sie sind in ihrer Form variabel und ihre Größe schwankt zwischen 0,22 und 2 µm. Sie können also die üblichen Sterilfilter aus Cellulose- und Polyvinylderivaten passieren, deren Porengröße um 0,2 µm schwanken.

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mycoplasmen sind häufig, sie sind lang andauernd und meist schwierig zu behandeln. Sie bewirken nicht immer dramatische Effekte und bleiben deshalb lange unentdeckt, obwohl sie vielfältig in den Stoffwechsel der befallenen Zellen eingreifen. Kontaminationen mit Mycoplasmen können zum Beispiel durch die Anfärbung der Mycoplasmen-DNA mit dem speziell an DNA bindenden Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) festgestellt werden (Russel *et al.* 1975). Die Mycoplasmen erscheinen hierbei als gleichmäßig geformte, kleine, hell leuchtende Punkte oder Ansammlungen von solchen auf den Zellen.

Für die Färbung wird das Medium von den Zellen entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation der Zellen mit einer DAPI-Methanol-Lösung (0,1 mg/ml) für 15 min bei 37 °C. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Zellen auf einem Objektträger in Moviol eingebettet und können unter dem Ölimmersionsobjektiv bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von Kontaminationen mit Mycoplasmen bietet die PCR. Bei dem Test werden 9 Oligonukleotide miteinander kombiniert, um mehrere Mycoplasmenspezies, die als Kontamination von Säugerzellen bekannt sind, detektieren zu können.

Etwa  $10^6$  Zellen wurden in einer 75 cm<sup>2</sup> großen Kulturflasche für mindestens drei Tage ohne Antibiotikum kultiviert und von dem Medium 3 ml für eine Mycoplasmen-PCR abgenommen. Nach der Zentrifugation in dem 1,5 ml Reaktionsgefäß für  $2 \times 5$  min bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Sediment nach einmaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O in 100 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min bei 95 °C aufgekocht und einer Phenol- Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach der Ethanol-Fällung wurde die Probe getrocknet und die



gegebenenfalls vorhandene DNA in 10 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Jeweils 1-2 µl der Proben wurden für die PCR verwendet.

Die PCR wurde mit der Biotherm-Polymerase durchgeführt und grundsätzlich nach dem bereits beschriebenen Protokoll verfahren. Die insgesamt 9 Oligonukleotide waren zu einem Primermix mit 5 µM je Oligo zusammengesetzt, von dem pro Ansatz je 1 µl eingesetzt wurde. Nur das PCR-Programm wich zum Teil von dem bekannten Protokoll ab und wird daher noch einmal aufgeführt:

|       |        |      |
|-------|--------|------|
| 95 °C | 7 min  | 1 ×  |
| 72 °C | 3 min  | 1 ×  |
| 65 °C | 2 min  | 1 ×  |
| 72 °C | 5 min  | 1 ×  |
| 95 °C | 4 sec  | 32 × |
| 65 °C | 8 sec  |      |
| 72 °C | 16 sec |      |
| 72 °C | 10 min | 1 ×  |

### 5.5.8 Infektionsversuche

Die verschiedenen Epithel- und Endothelzellen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 24 well-Platten (Nunc) auf Glas-Deckgläser ausgesät und über zwei Nächte bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor der Infektion mit etwa  $2 \times 10^5$  Zellen wurden diese mit DMEM-HEPES (25 mM) mit 1 % FCS gewaschen und in diesem Medium ohne Antibiotikum aufgenommen. HUVEC-Zellen wurden abweichend davon in ihrem Kultivierungsmedium ohne Zusatz der Antibiotika infiziert.

Die Infektion der semikonfluenten Monolayer erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  Bakterien, was etwa dem 25 – 50 an Pneumokokken pro Zelle entspricht. Die Bakterien wurden in THY-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen und bei einer optischen Dichte von 600 nm von etwa 0,4 für die Infektion eingesetzt. Mittels Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm wurden die Bakterien auf 0,1 eingestellt, was einer Bakterienzahl von  $10^8$  Bakterien pro ml entspricht. Aus der eingestellten Bakteriensuspension wurden die Zellen mit dem entsprechenden Volumen inokuliert. Die Infektionen der Monolayer wurden in der Regel über 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank durchgeführt. Nach 3 h wurden die nicht adhärenen Bakterien im Infektionsmedium durch dreimaliges Waschen mit Infektionsmedium entfernt. Nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd für mindestens eine halbe Stunde bei 4 °C fixiert.

### 5.5.9 Fixierung für die Doppelimmunfluoreszenz

Paraformaldehyd wurde als 37%ige Lösung angesetzt und bei –20 °C aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurde das PFA bei 70 °C aufgetaut und zu einer 1 - 3,7 %igen Lösung mit PBS verdünnt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 300 µl dieser Paraformaldehyd-Lösung aufgenommen und für mindestens 2 h bei 4 °C aufbewahrt.

### 5.5.10 Fixierung für die Raster-Elektronenmikroskopie

Bei der Fixierung für die Raster-Elektronenmikroskopie wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS in Cacodylat-Puffer (0,1 M Cacodylat (Dimethylarseninsäure Natriumsalz-Trihydrat), 0,09 M Sucrose, 0,01 M  $\text{MgCl}_2$ , 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ ) mit 3 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd aufgenommen und für mindestens 2 Stunden bei 4 °C aufbewahrt.

### 5.5.11 Präinkubation der Zellen

Für einige Versuchsteile wurden die Zellen vor der Infektion mit den Bakterien in den Vertiefungen der Kulturplatte mit Proteinen oder Antikörpern präinkubiert. Die Inkubation erfolgte für mindestens 20 min bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank. Die Infektion mit *S. pneumoniae* schloss sich direkt an.

### 5.5.12 Präinkubation der Bakterien

Sollten potentielle Adhäsine in Inhibitionsversuchen blockiert werden, wurden die für die Infektion eingestellten Pneumokokken mit Proteinen oder Antikörpern präinkubiert. Die Inkubation erfolgte für mindestens 15 min bei 37°C im Wasserbad. Die präinkubierten Bakteriensuspensionen wurden nach der Inkubation zusammen mit den Proteinen oder Antikörpern für die Infektion auf die Zellen gegeben.

### 5.5.13 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung adhärenter und invasiver Bakterien sowie zur Detektion von Proteinen oder anderer Strukturen auf und in den verwendeten Zellen wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit einem primären Antikörper das gewünschte Antigen detektiert. Gegen den ersten Antikörper wurde dann ein zweiter, fluorochrom-gekoppelter Antikörper eingesetzt, der im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden konnte. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Fluorochrome, Alexa 488 und Alexa 568, jeweils gekoppelt an Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper oder an Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet. Alexa 488 besitzt eine Anregungswellenlänge im blauen Spektralbereich und emittiert im grünen Bereich, Alexa 568 absorbiert im grünen Spektralbereich und fluoresziert rot. Die Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop mit Kameraaufsatz von Zeiss bei 1000-facher Vergrößerung ausgewertet. Die in dieser Arbeit dargestellten Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop der Firmen BioRad oder Zeiss angefertigt.

Für Adhärenz- und Invasionsfärbungen von Pneumokokken an bzw. in Epithel- und Endothelzellen wurden die Zellen zunächst in PBS mit 10 % FCS über mindestens eine halbe Stunde abgesättigt. Die Bakterien wurden anschließend mit Kaninchen-anti-*S. pneumoniae* IgG-Antikörpern detektiert. Nach der ersten anti-Pneumokokken-Inkubation wurde mit einem Alexa 488 gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert, um die adhärenenten Bakterien zu färben. Invasive Pneumokokken konnten nach der Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton-X-

100 auf die gleiche Weise detektiert werden, wobei dabei ein mit Alexa 568 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet wurde. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte stets in PBS mit 10 % FCS für 30 bis 45 min. Nach Färbung der Bakterien wurden die Glasdeckgläser mit den Zellen nach unten in einem Tropfen Moviol auf einem Glasobjektträger eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Präparate konnten so im Dunkeln bei 4 °C über einige Monate aufbewahrt werden.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops bei einer 1000fachen Vergrößerung. Adhärenente Bakterien konnten im Doppelfilter als gelbe Diplokokken detektiert werden. Invasive Bakterien erschienen rot.

#### 5.5.14 Apoptosenachweis

Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde die Zellen mit zwei verschiedenen Farbstoffen angefärbt. Das während der Apoptose von der Innenseite einer Plasmamembran nach außen beförderte Phosphatidylserin wird mit Annexin-V-Fluos detektiert. Da Phosphatidylserin auch bei nekrotischen Zellen erkannt wird, müssen diese Zellen von den apoptotischen unterschieden werden. Dafür wird Propidiumiodid verwendet, das in die DNA der nekrotischen Zellen interkallieren kann, in apoptotische Zellen aber nicht eindringen kann.

Für die Färbung werden die infizierten Zellen direkt nach dem Waschen mit PBS in Inkubationspuffer mit 20 µl/ml Annexin-V-Fluos und 1 µg/ml Propidiumiodid für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 5.5.15 Verwendete Antikörper und Antikörperverdünnungen für die Doppelimmunfluoreszenz

|  |       |
|--|-------|
| Kaninchen-anti- <i>S. pneumoniae</i> IgG | 1:100 |
| Kaninchen-anti-SC IgG                    | 1:50  |
| Kaninchen-anti-SH2 IgG                   | 1:50  |

#### Fluorochrom gekoppelte Antikörper

|   |       |
|---|-------|
| Alexa Fluor® 488 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG | 1:300 |
| Alexa Fluor® 568 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG | 1:300 |

#### Fluorochrom gekoppelte Proteine

|   |          |
|---|----------|
| Alexa Fluor® 488 gekoppeltes Phalloidin | 1:50     |
| Annexin-V-Fluos Alexa 488 konjugiert    | 20 µl/ml |
| Propidiumiodidlösung                    | 50 µg/ml |

#### 5.5.16 Kopplung von Protein an Latexbeads

Für die Kopplung von Proteinen an Latexpartikeln wurden Latexbeads mit einem Durchmesser von 3 µm (Sigma LB-30) verwendet. Jeweils 10<sup>8</sup> Latexbeads wurden

pro Ansatz mit 5 µg Protein gekoppelt. Dazu wurden die Partikel mit PBS gewaschen und für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Beads wurden in 100 µl PBS aufgenommen und das Protein dazugegeben. Die Inkubation mit dem Protein erfolgte unter Schütteln über Nacht bei 4 °C. Schließlich wurden die Latexbeads noch einmal mit PBS gewaschen und für die Inkubation mit den Zellen in Infektionsmedium aufgenommen. Vor der Inkubation mit den Zellen wurden die Beads mit BSA (10 mg/ml) in PBS für 30 min präinkubiert, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken.

#### 5.5.17 Vorbereitung der Latex-beads für die FACS-Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen bzw. Latexbeads in einer Suspension über ein Schlauchsystem durch einen Messkopf gepresst, der entweder eine oder zwei enge Öffnungen (zwischen 50 und 100 µm) besitzt. Die Zellen werden in dem laminaren Flüssigkeitsstrom so geführt, dass nur jeweils ein Latexbead die Öffnungen passieren kann. In dem Flusskanal wird ein Laserstrahl fokussiert. Der Laserstrahl trifft die Beads und wird durch die Beads entweder kleinwinklig oder großwinklig abgelenkt, wobei er Fluoreszenz- oder Lumineszenzerscheinungen aktiviert. Ein nachgeschalteter Digital-Analogwandler wertet die Daten anschließend aus. So können neben der Oberflächenbindung auch Größe, Volumen und Struktur von Zellen sowie diverse andere Parameter bestimmt werden.

Zur Kontrolle der Bindung von SpsA an 3 µm Latexbeads wurde das Protein von jeweils 50 µl der gecoateten Beads mit Antikörpern detektiert und mit einem FITC gekoppelten Antikörper markiert. Hierzu wurden die Latexbeads zunächst für 1 Stunde mit 200 µl PBS/BSA (10 mg/ml) bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das SpsA mit dem 1. AK (1:100 in PBS + 10 % FCS) für 30 min bei 4 °C detektiert. Ein gegen den 1. AK gerichteter zweiter FITC-markierter AK wurde für weitere 30 min bei 4 °C mit den Beads inkubiert. Die Latexbeads wurden in 50 µl PBS aufgenommen und bis zur FACS-Analyse bei 4 °C gelagert.

Als Kontrollen wurden bei der FACS Analyse auch ungecoatete Beads gemessen, sowie gecoatete Beads ohne Antikörperdetektion und gecoatete Beads, die nur mit dem zweiten FITC-markierten Antikörper inkubiert waren.

#### 5.5.18 Transfektion mit FuGENE 6

Die Transfektion von MDCK Zellen wurde mit Hilfe des FuGENE 6 Reagenz, einer kationischen Lipidmischung, nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 36 Stunden vor der Transfektion mit je  $0,5 - 1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in eine 24-well-Platte auf Glas-Deckgläser in Kulturmedium mit Antibiotikum ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium gegen 0,5 ml Antibiotika freies Medium ausgetauscht. Zur Herstellung des Transfektionskomplexes wurde zunächst serumfreies Kulturmedium in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben. 2 µl des FuGENE 6 Reagenz wurde direkt in das Medium pipettiert und 0,5 µg der Plasmid-DNA dazugegeben. Hierbei wurden das FuGENE Reagenz und die Plasmid-DNA im Verhältnis 2:1 bis 3:1 (µl:µg) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30-45 min bei Raumtemperatur wurde der Transfektionskomplex zu den Zellen gegeben und diese für 48 h bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

## Literatur

1. Alexander, J.E., Lock, R.A., Peeters, C.C.A.M., Poolman, T., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., Hansman, D., and Paton, J.C. (1994) Immunization of mice with pneumolysin toxoids confers significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 62:5683-5688.
2. AlonsoDeValesco, E., Verheul, A.F.M., Verhoef, J., Snippe, H. (1995) *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. *Micobiol. Rev.* 59: 591-603.
3. Alexander, J.E., Berry, A.M., Paton, J.C., Rubins, J.B., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1998) Amino acid changes affecting the activity of pneumolysin alter the behaviour of pneumococci in pneumonia. *Microb Pathog* 24(3):167-174.
4. Anderson, B., Dahmen, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G., Eden, C. (1983) Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococcal attaching to human pharyngeal epithelial cell. *J Exp Med* 158:559-570.
5. Andersson, B., Beachey, E.H., Tomasz, A., Tuomanen, E., and Svanborg-Eden, C. (1988) A sandwich adhesion on *Streptococcus pneumoniae* attaching to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Microb Pathog* 4(4):267-278.
6. Angel, C.S., Ruzek, M., and Hostetter, M.K. (1994) Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 170:600-608.
7. Appelbaum, P.C., Bhamjee, J.N., Scragg, J.N., Hallet, A.J., Bowen, A.F., and Cooper, R.C. (1997) *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* ii:995-997.
8. Appelbaum, P.C. (1992) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis* 15:77-83.
9. Avery, O.T., and Heidelberger, M. (1925) Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus. *J Exp Med* 42:367-376.
10. Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by desoxyribonucleic acid fractions isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 79:137-158.
11. Avery, O.T., and Morgan, H.J. (1925) Immunological reactions of the isolated carbohydrate and protein of pneumococcus. *J Exp Med* 42:347-353.
12. Bakos, M.A., Kurosky, A., and Goldblum, R.M. (1991) Characterization of a critical binding site for human polymeric Ig on secretory component. *J Immunol* 147(10):3419-3426.
13. Bakos, M. A., Widen, S. G., and Goldblum, R. M. (1994) Expression and purification of biologically active domain I of the human polymeric immunoglobulin receptor. *Mol Immunol*, 31, 165-168.
14. Balachandran, P., Hollingshead, S.K., Paton, J.C., and Briles, D.E. (2001) The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol* 183(10):3108-3116.
15. Banting, G., Brake, B., Braghetta, P., Luzio, J.P., and Stanley, K.K. (1989) Intracellular targeting signals of polymeric immunoglobulin receptors are highly conserved between species. *FEBS Lett* 254(1-2):177-183.
16. Benton, K.A., Paton, J.C., Briles, D.E. (1997) Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect Immun* 65(4):1237-1244.
17. Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. (2001)  $\alpha$ -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasminogen-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40:1273-1287.
18. Berry, A.M., Ogunniyi, A.D., Miller, D.C., and Paton, J.C. (1999) Comparative virulence of *Streptococcus pneumoniae* strains with insertion-duplication, point, and deletion mutations in the pneumolysin gene. *Infect Immun* 67(2):981-985.

19. Berry, A.M. and Paton, J.C. (1996) Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64:5255-5262.
20. Berry, A.M., and Paton, J.C. (2000) Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* 68:133-140.
21. Berry, A.M., Lock, R.A., and Paton, J.C. (1996) Cloning and characterization of nanB, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178(16):4854-4860.
22. Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989) Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 57(8):2324-2330.
23. Böttger E.C. (1988) High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electrotransformation. *Biotechniques* 6: 878-880.
24. Boulnois, G.J. (1992) Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 138:249-259.
25. Boulnois, G.J., Paton, J.C., Mitchell, T.J., and Andrew, P.W. (1991) Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5:2611-2616.
26. Brandis, J., Köhler, W., Eggers, H.J., and Pulverer, G. (1994) *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag.
27. Brandtzaeg, P. (1981) Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin Exp Immunol* 44:221-232.
28. Brandtzaeg, P., and Prydz, H. (1984) Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 311:71-73.
29. Breitfeld, P.P., Casanova, J.E., McKinnon, W.C., and Mostov, K.E. (1990) Deletions in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor differentially affect endocytotic rate and postendocytotic traffic. *J Biol Chem* 265:13750-13757.
30. Briles, D.E., Yother, J., and McDaniels, L.S. (1988) Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* 10: 372-374.
31. Briles, D. E., Crain, M. J., Gray, B. M., Forman, C. and Yother, J. (1992) Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 60: 111-116.
32. Brooks-Walter, A., Briles, D.E., and Hollingshead, S.K. (1999) The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* 67(12):6533-6542.
33. Broome, C.V., Facklam, R.R., Allen, J.R., Fraser, D.W., and Austrian, R. (1980) From the center for disease control. Epidemiology of pneumococcal serotypes in the United States, 1978--1979. *J Infect Dis* 141(1):119-123.
34. Brown, R.S., Lomrin, N., De Voss, J., Rahmaoui, C.M., Xie, M.H., Hua, T., Lidofsky, S.D., and Scharschmidt, B.F. (1995) Enhanced secretion of glycocholic acid in a specially adapted cell line is associated with overexpression of apparently novel ATP-binding cassette proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5421-5425.
35. Bruyn, G.A.W., Zegers, B.J.M., and van Furth, R. (1992) Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 14:251-262.
36. Burman, L.A., Norrby, R., and Trollfors, B. (1985) Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* 7(2):133-42.
37. Calvin N. M., Hanawalt P. C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170: 2796-2801.
38. Camara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994) A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* 62(9):3688-3695.

39. Canvin, J.R., Marvin, A.P., Sivakumaran, M., Paton, J.C., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1995) The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 172(1):119-123.
40. Casanova, J.E, Apodaca, G., and Mostov, K.E. (1991) An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Trends Cell Biol* 1(4):85.
41. Cheng, Q., Finkel, D., and Hostetter, M.K. (2000) Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry* 39(18):5450-5457.
42. Chhatwal, G.S., Dutra, I.S., Blobel, H. (1985) Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of groups A, B, C, and G streptococci. *Microbiol Immunol* 29(10):973-980.
43. Chudwin, D.S., Artrip, S.G., Korenblit, A., Schiffman, G., and Rao, S. (1985) Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 50:213-217.
44. Cleary, P., and Retnoningrum, D. (1994) Group A streptococcal immunoglobulin-binding proteins: adhesins, molecular mimicry or sensory proteins? *Trends Microbiol* 2: 131-136.
45. Collen D. and Verstraete M. (1975) Molecular biology of human plasminogen.II. Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb Diath Haemorrh* 34: 403-408.
46. Courtney, H.S., Dale, J.B., and Hasty, D.I. (1996) Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEP-2 tissue culture cells. *Infect Immun* 64(7):2415-2419.
47. Coyne, R.S., Siebrecht, M., Peitsch, M.C., and Casanova, J.E. (1994) Mutational analysis of polymeric immunoglobulin receptor/ligand interactions. Evidence for the involvement of multiple complementarity determining region (CDR)-like loops in receptor domain I. *J Biol Chem* 269(50):31620-31625.
48. Crottet, P., and Cortes, B. (1999) Mapping the interaction between murine IgA and murine secretory component carrying epitope substitutions reveals a role of domains II and III in covalent binding to IgA. *J Biol Chem* 274(44):31456-31462.
49. Cundell, C.R., Pearce, B.J., Young, A., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (1994) Protein dependent peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* mediate cytoadherence to type II lung cells and to human endothelial cells. *J Cell Biochem Suppl* 18A: 45.
50. Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan Heikkila I. and Tuomanen E.I. (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377:435-438.
51. Cundell, D., Masure, H.R., and Tuomanen, E.I. (1995) The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin Infect Dis* 21:204-211.
52. Cundell, D.R., and Tuomanen, E.I. (1994) Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Microb Pathog* 17(6):361-374.
53. Dagan, R., Isaachsen, M., Lang, R. R., Karpuch, J., Block, C., and J. Amir for the Israeli pediatric bacteremia and meningitis group (1994) Epidemiology of pediatric meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in Israel. *J. Infect. Dis.* 169: 912- 916.
54. Davies, T., Goering, R.V., Lovgren, M., et al. (1999) Molecular epidemiological survey of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asia, Europe, and North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:7-12.
55. de Oliveira, I. R., de Araujo, A. N., Bao, S. N., and Giugliano, L. G. (2001) Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 203, 29-33.
56. Denning, G.M. (1996) IL-4 and IFN- $\lambda$  synergistically increase total polymeric IgA receptor level in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. *J Immunol* 156:4807-4814.

57. Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.P. (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25:727-739.
58. Doern, G.V., Heilmann, K.P., Huynh, H.K., Rhomberg, P.R., Coffman, S.L., and Brueggemann, A.B. (2001) Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1721-1729.
59. Duthy, T.G., Ormsby, R.J., Giannakis, E., Ogunniyi, A.D., Stroehrer, U.H., Paton, J.C., and Gordon, D.L. (2002) The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. *Infect Immun* 70(10):5604-5611.
60. Elm, C., Braathen, R., Bergmann, S., Frank, R., Vaerman, J.P., Kaetzel, C.S., Chhatwal, G.S., Johansen, F.E., and Hammerschmidt, S. (2004) Ectodomains 3 and 4 of human polymeric immunoglobulin receptor (hplgR) mediate invasion of *Streptococcus pneumoniae* into the epithelium. *J Biol Chem* 279(8):6296-6304.
61. Emini E.A., Hughes J.V., Perlow D.S., Boyer J. (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55(3): 836-839.
62. Enriquez, F. J. and Riggs, M. W. (1998) Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*, 66, 4469-4473.
63. Eskola, J. (1995) Use of conjugate vaccines to prevent meningitis caused by *Haemophilus influenzae* type b or *Streptococcus pneumoniae*. *J Hosp Infect* 1:S85-90.
64. Fallgreen-Gebauer, E., Gebauer, W., Bastian, A., Kratzin, H.D., Eiffert, H., Zimmermann, B., Karas, M., and Hilschmann, N. (1993) The covalent linkage of secretory component to IgA. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 174: 1023-1028.
65. Fedson, D.S. (1999) The clinical effectiveness of pneumococcal vaccination: a brief review. *Vaccine* 1:S85-90.
66. Felmingham, D., and Washington, J. (1999) Trends in the antimicrobial susceptibility of bacterial respiratory tract pathogens-findings of the Alexander Project 1992-1996. Alexander Project Group. *J Chemother* 11:5-21.
67. Fiedler, M.A., Kaetzel, C.S., and Davis, P.B. (1991) Sustained production of secretory component by human tracheal epithelial cells in primary culture. *Am J Physiol* 261(4 Pt 1):L255-261.
68. Fine, D.P. (1975) Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* 12:772-778.
69. Frank, R. (1992) Spot-synthesis: an easy technique for positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-9232.
70. Gan, Y. J., Chodosh, J., Morgan, A., and Sixbey, J. W. (1997) Epithelial cell polarization is a determinant in the infectious outcome of immunoglobulin A-mediated entry by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 71, 519-526.
71. Garcia, P., Garcia, J.L., Garcia, E., and Lopez, R. (1986) Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* 43:265-272.
72. Garnier, J., Osguthorpe, D.J., and Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 120:97-120.
73. Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E. (1993) The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 61:1538-1543.
74. Giffroy, D., et al. (1998) In vivo stimulation of polymeric Ig receptor transcytosis by circulating polymeric IgA in rat liver. *Int Immunol* 10:347-354.
75. Gillespie, S.H. (1989) Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. *J Med Microbiol* 28(4):237-248.



76. Gillespie, S.H., and Balakrishnan, I. (2000) Pathogenesis of pneumococcal infection. *J Med Microbiol* 49(12):1057-1067.
77. Godding, V., Sibille, Y., Massion, P.P., Delos, M., Sibille, C., Thurion, P., Giffroy, D., Langendries, A., and Vaerman, J.P. (1998) Secretory component production by human bronchial epithelial cells is upregulated by interferon gamma. *Eur Respir J* 11(5):1043-1052.
78. Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E., and Masure, H.R. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68: 5690-5695.
79. Gray, B.M., Converse III, G.M., and Dillon Jr, H.C. (1979) Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J Infect Dis* 140: 923-933.
80. Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27:113-159.
81. Hammerschmidt, S., Remane, P., Bethe, G., and Chhatwal, G.S. (1999) Identification of the pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67:1683-1687.
82. Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G.S. (1997) SpsA, a novel pneumococcal protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 25: 1113-1124.
83. Hammerschmidt, S., Tillig, M.P., Wolff, S., Vaerman, J.-P., and Chhatwal, G.S. (2000) Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* 36:726-736.
84. Hansman, D., and Bullen, M.M. (1967) A resistant pneumococcus [letter]. *Lancet* 2:264-265.
85. Håverstein, L. S., Coomaraswamy, G. and Morrison, D. A. (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9052-9056.
86. Hayashi, M., Takenouchi, N., Asano, M., Kato, M., Tsurumachi, T., Saito, T., Moro, I. (1997) The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) in a human epithelial cell-line is upregulated by interleukin-1. *Immunology* 92:220-225.
87. Hendrickson, B.A., Guo, J., Brown, I., Dennis, K., Marcellino, D., Hetze, J., and Herold, B.C. (2000) Decreased vaginal disease in J-chain-deficient mice following herpes simplex type 2 genital infection. *Virology* 271(1): 155-162.
88. Heremans, J.F. (1975) in *The Antigens*, Vol.2, Academic Press, NewYork, pp365-522.
89. Hexham, J.M., White, K.D., Carayannopoulos, L.N., Mandecki, W., Brisette, R., Yang, Y.S., and Capra, J.D. (1999) A human immunoglobulin (Ig)A calpha3 domain motif directs polymeric Ig receptor-mediated secretion. *J Exp Med* 189(4):747-752.
90. Hirt, R.P., Hughes, G.J., Frutiger, S., Michetti, P., Perregaux, C., Poulain-Godefrov, O., Jeanguenat, N., Neutra, M.R., and Kraehenbuhl, J.P. (1993) Transcytosis of the polymeric Ig receptor requires phosphorylation of serine 664 in the absence but not the presence of dimeric IgA. *Cell* 74(2):245-255.
91. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
92. Hofmann, J., Cetron, M.S., Farley, M.M., et al. (1995) The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 333:481-486.
93. Holmes A.R., McNab R., Millsap K.W., Rohde M., Hammerschmidt S., Mawdsley J.W., and Jenkinson, H.F. (2001) The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41:1395-1408.
94. Houldsworth, S., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994) Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 $\beta$  by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62:1501-1513.
95. Hunziker, W., Måle, P., and Mellmann, I. (1990) Differential microtubule requirements for transcytosis in MDCK cells. *EMBO* 9:3515-3525.

96. Hunziker, W., and Peters, P.J. (1998) Rab 17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells. *J Biol Chem* 273:15734-15741.
97. Iannelli, F., Oggioni, M. R., and Pozzi, G. (2002) Allelic variation in the highly polymorphic locus pspC of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, 284, 63-71.
98. Janin, J. and Wodak, S. (1978) Conformation of amino acid side-chains in proteins. *J Mol Biol*, 125, 357-386.
99. Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G., and Björck, L. (2000) Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* 275(47):37257-37263.
100. Jerlström, P.G., Chhatwal, G.S., and Timmis, K.N. (1991) The IgA-binding beta antigen of the c protein complex of Group B streptococci: sequence determination of its gene and detection of two binding regions. *Mol Microbiol* 5: 843-849.
101. Johnson, K., Geoffroy, C., and Alouf, J.E. (1980) Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun* 27:97-101.
102. Johnson, M.K. (1977) Cellular localisation of pneumolysin. *FEMS Microbiology Letters* 2: 243-245.
103. Jones, R.N. (1999) The impact of antimicrobial resistance: changing epidemiology of community-acquired respiratory-tract infections. *Am J Health Syst Pharm* 56(Suppl 3):S4-11.
104. Jorgensen, J.H., Doern, G.V., Maher, L.A. (1990) Antimicrobial resistance among respiratory isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2075-2080.
105. Kaetzel, C.S. (2001) Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? *Curr Biol* 11(1):R35-38.
106. Kaetzel, C.S., Blanch, V.J., Hempen, P.M., Phillips, K.M., Piskurich, J.F., and Youngman, K.R. (1997) The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis. *Biochem Soc Trans* 25(2):475-480.
107. Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. (1998) *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Aufl., Thieme Verlag.
108. Kilian, M., Mestecky, J., and Russel, M.W. (1988) Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* 52:296-303.
109. Kim J.O., and Weiser J.N. (1998) Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 177: 368-377.
110. Krivan, H.C., Roberts, D.D., and Ginsberg, V. (1988) Many pulmonary pathogenic bacteria bind specific to the carbohydrate sequence GalNAc $\beta$ 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6157-6161.
111. Kvale, D., Lofhaug, D., Sollid, L., Brandtzaeg, P. (1988) Tumor necrosis factor  $\alpha$  upregulates expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric Ig. *J Immunol* 140:3086-3089.
112. Lacks, S., and Hotchkiss, R.D. (1960) Formation of amylomaltase after genetic transformation of pneumococcus. *Biochim Biophys Acta* 45:155-163.
113. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-685.
114. Lancefield, R.C. (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.
115. Lee, C.-J., Banks, S. D. and Li, J. P. (1991) Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 89-114.
116. Lin, C. T., Lin, C. R., Tan, G. K., Chen, W., Dee, A. N., and Chan, W. Y. (1997) The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Pathol*, 150, 1745-1756.

117. Lin, C. T., Kao, H. J., Lin, J. L., Chan, W. Y., Wu, H. C., and Liang, S. T. (2000) Response of nasopharyngeal carcinoma cells to Epstein-Barr virus infection in vitro. *Lab Invest*, 80, 1149-1160.
118. Lock, R.A., Paton, J.C., and Hansman, D. (1988) Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 4(1):33-43.
119. Lu, L., Lamm, M.E., Li, H., Cortesy, B., and Zhang, J.R. (2003) The human polymeric immunoglobulin receptor binds to *Streptococcus pneumoniae* via domains 3 and 4. *J Biol Chem* 278(48):48178-48187.
120. Luton, F. and Mostov, K. E. (1999) Transduction of basolateral-to-apical signals across epithelial cells: ligand-stimulated transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor requires two signals. *Mol Biol Cell*, 10, 1409-1427.
121. Luton, F., Verges, M., Vaerman, J. P., Sudol, M., and Mostov, K. E. (1999) The SRC family protein tyrosine kinase p62yes controls polymeric IgA transcytosis in vivo.
122. Maples, C.J., Ruiz, W.G., and Apodaca, G. (1997) Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 272:6741-6751.
123. McCullers, J.A., and Tuomanen, E.I. (2001) Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci* 6:D877-889.
124. McDaniel, L.S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W.R., and Briles, D.E. (1987) Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J Exp Med* 165(2):381-394.
125. McDougal, L.K., Facklam, R., Reeves, M., et al. (1992) Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 36:2176-2184.
126. McGee, D.W., Aicher, W.K., Eldridge, J.H., Peppard, J.V., Mestecky, J., McGhee, J.R. (1991) Transforming growth factor- $\beta$  enhances secretory component and major histocompatibility complex class I antigen expression in rat IEC-6 intestinal epithelial cells. *Cytokine* 3:543-550.
127. Mitchell, T.J., Andrew, P.W. (1997) Biological properties of pneumolysin. *Microb Drug Resist* 3(1):19-26.
128. Mostov, K. E. (1984) Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 12: 63-84.
129. Musher, D.M. (1992) Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 14(4):801-807.
130. Navarre, W. W., and Schneewind, O. (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 14: 115-121.
131. Neufeld, F. (1902) Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. *Z. Hyg Infektionskr* 40:4-72.
132. Okamoto, C.T., Shia, S.-P., Bird, C., Mostov, K.E., and Rothe, M.G. (1992) The cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor contains two internalization signals that are distinct from its basolateral sorting signal. *J Biol Chem* 267:9925-9932.
133. Outlaw, M. C. and Dimmock, N. J. (1990) Mechanisms of neutralization of influenza virus on mouse tracheal epithelial cells by mouse monoclonal polymeric IgA and polyclonal IgM directed against the viral haemagglutinin. *J Gen Virol*, 71 ( Pt 1), 69-76.
134. Paton J.C. (1996) The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol* 4:103-106.
135. Paton, J.C., Morona, J.K., and Morona, R. (1997) Characterization of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Microb Drug Resist* 3(1):89-99.
136. Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W., and Weiser, J.N. (2000) Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* 68(7):3990-3997.

137. Phillips, J.O., Everson, M.P., Moldoveanu, Z., Lue, C., Mestecky, J. (1990) Synergistic effect of IL-4 and IFN- $\lambda$  on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J Immunol* 145:1740-1744.
138. Piskurich, J.F., France, J.A., Tamer, C.M., Willmer, C.A., Kaetzel, C.S., and Kaetzel, D.M. (1993) Interferon-gamma induces polymeric immunoglobulin receptor mRNA in human intestinal epithelial cells by a protein synthesis dependent mechanism. *Mol Immunol* 30(4):413-4121.
139. Plotkowski, M.C., Puchelle, E., Beck, G., Jacquot, J., and Hannoun, C. (1986) Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am Rev Respir Dis* 134(5):1040-1044.
140. Poulsen K., Reinhold J., Kilian M. (1996) Characterization of the *S. pneumoniae* Immunoglobulin A1 protease gene ( iga) and its translation product. *Infect. Immun.* 64 (10): 3957-3966.
141. Rayner, C. F. J., Jackson, A. D., Rutman, A. (1995) Interaction of pneumolysin-sufficient and – deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.* 63: 422-427.
142. Reinert, R.R., Queck, A., Kauffhold, A., Kresken, M., and Luticken, R. (1995) Antimicrobial resistance and type distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Germany, 1992-1994. *Clin Infect Dis* 21:1398-1401.
143. Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., Garcia-Bustos, J.F., Hoffmann, M.K., and Tuomanen, E. (1989) Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun* 57:1890-1893.
144. Ring A., Weiser J.N., and Tuomanen J.N. (1998) Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 102: 347-360.
145. Rojas, R. and Apodaca, G. (2002) Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 944-955.
146. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, H.R. (1997) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 25:819-829.
147. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 481-491.
148. Salyers, A. A., Whitt, D. D. (1994) *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, ASM Press, Washington D.C.
149. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.
150. Sampson, J.S., O'Connor, S.P., Stinson, A.R., Tharpe, J.A., and Russel, H. (1994) Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect Immun* 62:319-324.
151. Sanchez-Beato, A., Lopez, R., and Garcia, J.L. (1998) Molecular characterization of PcpA: a novel cholin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 164:207-214.
152. Sixbey, J. W. and Yao, Q. Y. (1992) Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science*, 255, 1578-1580.
153. Schlegel, H.G., (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme Verlag.
154. Scott, L.J., and Hubbard, A.L. (1992) Dynamics of four rat liver plasma membrane proteins and polymeric IgA receptor. Rates of synthesis and selective loss into the bile. *J Biol Chem* 267(9):6099-6106. Erratum in: *J Biol Chem* (1993) 268(25):19160.
155. Solari, R., and Kraehenbuhl, J.P. (1984) Biosynthesis of the IgA antibody receptor: a model for the trans-epithelial sorting of a membrane glycoprotein. *Cell* 36:61-71.

156. Song, J.H., Lee, N.Y., Ichiyama, S., et al. (1999) Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin Infect Dis* 28:1206-1211.
157. Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C., and Masure, H.R. (1996) Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 19(4):803-813.
158. Sternberg, G.M. (1881) A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Board of Health Bulletin* 2:781-783.
159. Sztul, E., Kaplin, A., Saucan, L., and Palade, G. (1991) Protein traffic between distinct plasma membrane domains: isolation and characterization of vesicular carriers involved in transcytosis. *Cell* 64(1):81-89.
160. Talay, S.R., Valentin-Weigand, P., Jerlström, P.G., Timmis, K.N. and Chhatwal, G.S. (1992) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* 60: 3837-3844.
161. Talkington, D.F., Crimmins, D.L., Voellinger, D.C., Yother, J., and Briles, D.E. (1991) A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: isolation, protective abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence. *Infect Immun* 59(4):1285-1289.
162. Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., and Fraser, C.M. (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506.
163. Tomasz, A. (1995) The pneumococcus at the gates. *N Engl J Med* 333:514-515.
164. Tomasz, A., and Fischer (2000) The cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Gram-positive pathogens*, Eds: Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood J.I. ASM Press, Washington D.C.
165. Tu, A.-H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., and Szalai, A.J. (1999) Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67:4720-4724.
166. Tuomanen, E.I., Austrian, R. and Masure, H.R. (1995) Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 332:1280-1284.
167. Underdown, B.J., and Schiff, J.M. (1986) Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 4:389-417.
168. van Dam, J.E.G., Flier, A., and Snippe, H. (1990) Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Antonie Leeuwenhoek* 58:1-47.
169. van IJzendoorn, S.C.D., Tuvim, M.J., Weimbs, T., Dickey, B.F., and Mostov, K.E. (2002) Direct interactions between Rab3b and the polymeric immunoglobulin receptor controls ligand-stimulated transcytosis in epithelial cells. *Dev. Cell* 2:219-228.
170. Vollmer, W., and Tomasz, A. (2001) Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 39(6):1610-1622.
171. von Kries, R., Siedler, A., Schmitt, H.J., and Reinert, R.R. (2000) Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 31(2) :482-487.
172. Wang, X., Kurnar, R., Navarre, J., Casanova, J.E., and Goldenring, J.R. (2000) Regulation of vesicle trafficking in Madin-Darby canine kidney cells by Rab 11a and Rab 25. *J Biol Chem* 275:29138-29146.
173. Wani, J.H., Gilbert, J.V., Plaut, G., and Weiser, J.N. (1996) Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 64(10):3967-3974.

174. Watson, D.A., and Musher, D.M. (1990) Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* 58:3135-3138.
175. Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., and Masure, H.R. (1994) Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 62:2582-2589.
176. Westerlund, B., and Korhonen, T.K. (1993) Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 9(4):687-694.
177. Winkelstein, J.A., and Tomasz, A. (1978) Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J Immunol* 120(1):174-178.
178. Wurzner, R. (1999) Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. *Mol Immunol* 36(4-5):249-260.
179. Yother, J., and White, J.M. (1994) Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* 176:2976-2985.
180. Yother, J., and Briles, D.E. (1992) Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J Bacteriol* 174:601-609.
181. Yother J., McDaniel L., Briles D.E. (1986) Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 168: 1463-1465.
182. Zhang, J.R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W., and Tuomanen, E.I. (1999) Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol* 31(5):1477-1488.
183. Zhang, J.-R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M. and Tuomanen, E. (2000) The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102:827-837.

## 7 Anhang

### I. Spotmembran Sequenzen der Spots

| Spot | Sequenz                | Spot | Sequenz                |
|------|------------------------|------|------------------------|
| 1    | MLLFVLTCLLAVFPA        | 54   | <b>QKRKSLYKQIGLYPV</b> |
| 2    | FVLTCLLAVFPAIST        | 55   | <b>KSLYKQIGLYPVLVI</b> |
| 3    | TCLLAVFPAISTKSP        | 56   | YKQIGLYPVVIDSS         |
| 4    | LAVFPAISTKSPIFG        | 57   | IGLYPVVIDSSGYV         |
| 5    | FPAISTKSPIFGPEE        | 58   | YPVLVIDSSGYVNP         |
| 6    | ISTKSPIFGPEEVNS        | 59   | LVIDSSGYVNPNTG         |
| 7    | KSPIFGPEEVNSVEG        | 60   | <b>DSSGYVNPNTGRIR</b>  |
| 8    | IFGPEEVNSVEGNSV        | 61   | <b>GYVNPNTGRIRLDI</b>  |
| 9    | PEEVNSVEGNSVSIT        | 62   | <b>NPNTGRIRLDIQGT</b>  |
| 10   | VNSVEGNSVSITCYY        | 63   | <b>YTGRIRLDIQGTGQL</b> |
| 11   | VEGNSVSITCYYPPT        | 64   | <b>RIRLDIQGTGQLLFS</b> |
| 12   | NSVSITCYYPPTSVN        | 65   | LDIQGTGQLLFSVVI        |
| 13   | SITCYYPPTSVNRHT        | 66   | QGTGQLLFSVVINQL        |
| 14   | <b>CYYPPTSVNRHTRKY</b> | 67   | GQLLFSVVINQLRLS        |
| 15   | <b>PPTSVNRHTRKYWCR</b> | 68   | LFSVVINQLRLSDAG        |
| 16   | <b>SVNRHTRKYWCRQGA</b> | 69   | VVINQLRLSDAGQYL        |
| 17   | <b>RHTRKYWCRQGARGG</b> | 70   | NQLRLSDAGQYLCQA        |
| 18   | <b>RKYWCRQGARGGCIT</b> | 71   | RLSDAGQYLCQAGDD        |
| 19   | WCRQGARGGCITLIS        | 72   | DAGQYLCQAGDDSNS        |
| 20   | QGARGGCITLISSEG        | 73   | QYLCQAGDDSNSNKK        |
| 21   | RGGCITLISSEGYVS        | 74   | CQAGDDSNSNKKNAD        |
| 22   | CITLISSEGYVSSKY        | 75   | GDDSNSNKKNADLQV        |
| 23   | LISSEGYVSSKYAGR        | 76   | <b>SNSNKKNADLQVLKP</b> |
| 24   | SEGYVSSKYAGRANL        | 77   | <b>NKKNADLQVLKPEPE</b> |
| 25   | YVSSKYAGRANLTNF        | 78   | NADLQVLKPEPELVY        |
| 26   | SKYAGRANLTNFPEN        | 79   | LQVLKPEPELVYEDL        |
| 27   | AGRANLTNFPENGTF        | 80   | LKPEPELVYEDLRGS        |
| 28   | ANLTNFPENGTFVFN        | 81   | EPELVYEDLRGSVTF        |
| 29   | TNFPENGTFVFNIAQ        | 82   | LVYEDLRGSVTFHCA        |
| 30   | PENGTFVFNIAQLSQ        | 83   | EDLRGSVTFHCAALGP       |
| 31   | GTFVFNIAQLSQDDSD       | 84   | RGSVTFHCAALGPEVA       |
| 32   | VFNIAQLSQDDSDGRY       | 85   | VTFHCAALGPEVANVA       |
| 33   | IAQLSQDDSDGRYKCG       | 86   | HCAALGPEVANVAKFL       |
| 34   | LSQDDSDGRYKCGGLI       | 87   | LGPEVANVAKFLCRQ        |
| 35   | DDSDGRYKCGGLINSR       | 88   | EVANVAKFLCRQSSG        |
| 36   | GRYKCGGLINSRGLS        | 89   | NVAKFLCRQSSGENC        |
| 37   | KCGGLINSRGLSFDV        | 90   | KFLCRQSSGENCDVV        |
| 38   | LGINSRGLSFDVSLE        | 91   | CRQSSGENCDVVVNT        |
| 39   | NSRGLSFDVSLEVSQ        | 92   | SSGENCDVVVNTLGK        |
| 40   | GLSFDVSLEVSQGP         | 93   | ENCDVVVNTLGKRAP        |
| 41   | FDVSLEVSQGPGLLN        | 94   | DVVVNTLGKRAPAFE        |
| 42   | SLEVSQGPGLLNDDTK       | 95   | <b>VNTLGKRAPAFEGRI</b> |
| 43   | VSQGPGLLNDDTKVYT       | 96   | <b>LGKRAPAFEGRILLN</b> |
| 44   | GPGLLNDDTKVYTVDL       | 97   | RAPAFEGRILLNPDQ        |
| 45   | LLNDTKVYTVDLGRT        | 98   | AFEGRILLNPDQDKG        |
| 46   | DTKVYTVDLGRTVTI        | 99   | GRILLNPDQDKGSFS        |
| 47   | VYTVDLGRTVTINCP        | 100  | LLNPDQDKGSFSVVI        |
| 48   | VDLGRTVTINCPFKT        | 101  | PQDKGSFSVVTITGL        |
| 49   | GRTVTINCPFKTENA        | 102  | KDGSFSVVTITGLRKE       |
| 50   | VTINCPFKTENAQKR        | 103  | SFSVVTITGLRKEDAG       |
| 51   | <b>NCPFKTENAQKRKSL</b> | 104  | VVITGLRKEDAGRYL        |
| 52   | <b>FKTENAQKRKSLYKQ</b> | 105  | TGLRKEDAGRYLCGA        |
| 53   | <b>ENAKRKSLYKQIGL</b>  | 106  | RKEDAGRYLCGAHSD        |

| Spot | Sequenz                | Spot | Sequenz         |
|------|------------------------|------|-----------------|
| 107  | DAGRYLCGAHSDGQL        | 168  | GCQALPSQDEGPSKA |
| 108  | RYLCGAHSDGQLQEG        | 169  | ALPSQDEGPSKAFVN |
| 109  | CGAHSDGQLQEGSPI        | 170  | SQDEGPSKAFVNCDE |
| 110  | HSDGQLQEGSPIQAW        | 171  | EGPSKAFVNCDENSR |
| 111  | GQLQEGSPIQAWQLF        | 172  | SKAFVNCDENSRVLS |
| 112  | QEGSPIQAWQLFVNE        | 173  | FVNCDENSRVLSLTL |
| 113  | SPIQAWQLFVNEEST        | 174  | CDENSRVLSLTLNLV |
| 114  | QAWQLFVNEESTIPR        | 175  | NSRVLSLTLNLVTRA |
| 115  | QLFVNEESTIPRSPT        | 176  | LVSLTLNLVTRADEG |
| 116  | VNEESTIPRSPTVVK        | 177  | LTNLVTRADEGWYW  |
| 117  | ESTIPRSPTVVKGVA        | 178  | NLVTRADEGWYWCGV |
| 118  | IPRSPTVVKGVAGSS        | 179  | TRADEGWYWCGVKQG |
| 119  | SPTVVKGVAGSSVAV        | 180  | DEGWYWCGVKQGHFY |
| 120  | VVKGVAGSSVAVLCP        | 181  | WYWCGVKQGHFYGET |
| 121  | GVAGSSVAVLCPYNR        | 182  | CGVKQGHFYGETAAV |
| 122  | GSSVAVLCPYNRKES        | 183  | KQGHFYGETAAVYVA |
| 123  | <b>VAVLCPYNRKESKSI</b> | 184  | HFYGETAAVYVAVEE |
| 124  | <b>LCPNRKESKSIKYW</b>  | 185  | GETAAVYVAVEERKA |
| 125  | <b>YNRKESKSIKYWCLW</b> | 186  | AAVYVAVEERKAAGS |
| 126  | <b>KESKSIKYWCLWEGA</b> | 187  | YVAVEERKAAGSRDV |
| 127  | <b>KSIKYWCLWEGAQNG</b> | 188  | VEERKAAGSRDVSLA |
| 128  | KYWCLWEGAQNGRCP        | 189  | RKAAGSRDVSLAKAD |
| 129  | CLWEGAQNGRCPLL         | 190  | AGSRDVSLAKADAAP |
| 130  | EGAQNGRCPLLVDSE        | 191  | RDVSLAKADAAPDEK |
| 131  | QNGRCPLLVDSEGWV        | 192  | SLAKADAAPDEKVLD |
| 132  | RCPLLVDSEGWVKAQ        | 193  | KADAAPDEKVLDSGF |
| 133  | LLVDSEGWVKAQYEG        | 194  | AAPDEKVLDSGFREI |
| 134  | DSEGWVKAQYEGRLS        | 195  | DEKVLDSGFREIENK |
| 135  | GWVKAQYEGRLSLLE        | 196  | VLDSGFREIENKAIQ |
| 136  | KAQYEGRLSLLEEPG        | 197  | SGFREIENKAIQDPR |
| 137  | YEGRLSLLEEPGNGT        | 198  | REIENKAIQDPRLFA |
| 138  | RLSLLEEPGNGTFTV        | 199  | ENKAIQDPRLFAEEK |
| 139  | LLEEPGNGTFTVILN        | 200  | AIQDPRLFAEEKAVA |
| 140  | EPGNGTFTVILNQLT        |      |                 |
| 141  | NGTFTVILNQLTSRD        |      |                 |
| 142  | FTVILNQLTSRDAGF        |      |                 |
| 143  | ILNQLTSRDAGFYWC        |      |                 |
| 144  | QLTSRDAGFYWCLTN        |      |                 |
| 145  | SRDAGFYWCLTNGDT        |      |                 |
| 146  | AGFYWCLTNGDTLWR        |      |                 |
| 147  | YWCLTNGDTLWRTTV        |      |                 |
| 148  | LTNGDTLWRTTVEIK        |      |                 |
| 149  | GDTLWRTTVEIKIIE        |      |                 |
| 150  | LWRTTVEIKIIEGEP        |      |                 |
| 151  | TTVEIKIIEGEPNLK        |      |                 |
| 152  | EIKIIEGEPNLKVPG        |      |                 |
| 153  | IIEGEPNLKVPGNVT        |      |                 |
| 154  | GEPNLKVPGNVTAVL        |      |                 |
| 155  | NLKVPGNVTAVLGET        |      |                 |
| 156  | VPGNVTAVLGETLKV        |      |                 |
| 157  | NVTAVLGETLKVPC         |      |                 |
| 158  | AVLGETLKVPCHFPC        |      |                 |
| 159  | GETLKVPCHFPCFSS        |      |                 |
| 160  | LKVPCHFPCFSSYE         |      |                 |
| 161  | PCHFPCFSSYEKYW         |      |                 |
| 162  | FPCKFSSYEKYWCKW        |      |                 |
| 163  | KFSSYEKYWCKWNNT        |      |                 |
| 164  | SYEKYWCKWNNTGCQ        |      |                 |
| 165  | KYWCKWNNTGCQALP        |      |                 |
| 166  | CKWNNTGCQALPSQD        |      |                 |
| 167  | NNTGCQALPSQDEGP        |      |                 |

Spots, die eine SpsA-Bindung gezeigt hatten, sind grau hinterlegt.



## II. Laborgeräte

|   |                   |
|---|-------------------|
| Agarosegel-Elektrophoresekammer                               | Gibco             |
| Autoklav (Tecnoklav 50)                                       | Tecnomara         |
| Brutschrank (37°C; 28°C)                                      | Heraeus           |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator (5 % CO <sub>2</sub> )             | Forma Scientific  |
| Econo-Column Pump   | Bio-Rad           |
| Mit Photometer 2238 Unicord SII                               | Pharmacia         |
| Mit Schreiber 2210 Recorder 2-Channel                         | Pharmacia         |
| Eismaschine   | Ziegra            |
| Elektroporationsgerät   | Bio-Rad           |
| Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand)           | Bio-Rad           |
| Feinwaage Sartorius MC1 Research RC2505                       | BLB               |
| French® Pressure Cell   | SLM Instruments   |
| Gel Air Drying System   | Bio-Rad           |
| Heizblock (Thermomixer 5436)                                  | Eppendorf         |
| Hybridisierungssofen  | Biometra          |
| Inkubationsschüttler  | HAT               |
| Magnetrührer M20/1  | Franco®           |
| Mikroskope  |                   |
| Phasenkontrastmikroskop ID 02                                 | Zeiss             |
| Fluoreszenzmikroskop Axioskop                                 | Zeiss             |
| Konfokales Mikroskop MRC 1024                                 | Bio-Rad           |
| Mikrowelle  | AEG               |
| Neubauer Zählkammer   | Brand             |
| PCR-Thermocycler  | Hybaid            |
| pH-Meter CG 804   | Schott            |
| Photometer (4054 UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec Plus) | Pharmacia         |
| Power Supply 200/2.0 und Power Pac 300                        | Bio-Rad           |
| SDS-Gelkammer   | Bio-Rad           |
| Semi-Dry-Trans-Blot® SD                                       | Bio-Rad           |
| Steril-Werkbank Lamin Air®HLB 2427                            | Heraeus           |
| Thermomixer 5436  | Eppendorf         |
| Ultraschallgerät (Sonifier 250 und Ultrasonic cleaner)        | Branson, Unisonic |
| UV-Stratalinker 1800  | Stratagene        |
| Video-Dokumentation (Midi-Doku™)                              | Herolab           |
| Vortex Genie 2  | Hobein AG         |

|  |           |
|--|-----------|
| Waage 2200S                                      | Sartorius |
| Wasserheizbad                                    | GFL®      |
| Zentrifugen                                      |           |
| Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge | DuPont    |
| Omnifuge 2.0RS                                   | Heraeus   |
| Biofuge 13                                       | Heraeus   |
| Zentrifuge 5415 C und 5417 R                     | Eppendorf |

### III. Verbrauchsmaterial

|   |            |
|---|------------|
| Dialyseschlauch Servapor®                                     | Serva      |
| Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml                              | Sarstedt   |
| Injektionskanüle 0,9 x 40 mm                                  | Enosa      |
| Kurzpipette, 5 ml und 20 ml (steril, Plastik)                 | Sterilin   |
| Nitrocellulose-Membran  | Bio-Rad    |
| Nylonmembran, (PVDF, Immobilon™)                              | Millipore  |
| Mikrotiterplatten, Maxisorp                                   | Nunc       |
| Parafilm „M“®   | ANC        |
| Pasteur-Pipetten  | Hirschmann |
| PCR-Reaktionsgefäße   | Greiner    |
| Petrischalen für Bakterienkultur                              | Greiner    |
| Petrischalen für Zellkultur                                   | Nunc       |
| Pipettenspitzen Easy Load, 200 µl und 1000 µl                 | Greiner    |
| Plastikküvetten 1 ml  | Greiner    |
| PVDF-Membran  | Millipore  |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml                               | Eppendorf  |
| Röntgenfilme  | Kodak      |
| Skalpellklingen, spitz  | Bahia      |
| Steril-Filter (0,2 µm)  | Sartorius  |
| Whatman-Filterpapier  | Bio-Rad    |
| Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> | TPP        |
| Zellkulturplatte mit 4 Vertiefungen                           | Nunc       |
| Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen                          | TPP        |
| Zentrifugenröhrchen 14 ml                                     | Greiner    |

## IV. Chemikalien

|  |                  |
|--|------------------|
| Acrylamid-N,N-Methylen-Bisacrylamid (30 % / 0,8 %) | Roth             |
| Agar Agar  | Difco            |
| Agarose  | Gibco            |
| Aktivkohle   | Sigma            |
| Ampicillin   | Sigma            |
| Bacto-Agar   | Difco            |
| Bacto Trypton                                      | Difco            |
| Biotin   | Sigma            |
| Blutagar-Platten                                   | Becton Dickinson |
| BSA  | Sigma            |
| CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat z.A. (~99,5%)          | Merck            |
| Chloramphenicol                                    | Serva            |
| Chloronaphthol                                     | Sigma            |
| Coomassie Brilliant Blue™ R250                     | Bio-Rad          |
| L-Cystein  | Sigma            |
| D-+-Glucose  | Sigma            |
| DMEM   | Gibco            |
| DMSO   | Sigma            |
| ECL-Reagenz  | Amersham         |
| EDTA   | Riedel-de-Haën   |
| Eisensulfat  | Sigma            |
| Eisessig   | Baker            |
| Erythromycin                                       | Sigma            |
| Ethanol z.A. (~99,8%)                              | Merck            |
| Ethanol (vergällt)                                 | Merck            |
| FCS (Fetal Calf Serum)                             | Greiner          |
| Fleischextrakt                                     | Merck            |
| Formamid   | Merck            |
| Glutamin   | Gibco            |
| Glycerin z.A. (~ 87 %)                             | Merck            |
| Glycin   | Merck            |
| Hefe-Extrakt                                       | Difco            |
| Hering Sperm DNA                                   | Gibco            |
| Imidazol   | Sigma            |
| Immersionsöl                                       | Zeiss            |

|   |                |
|---|----------------|
| IPTG  | Sigma          |
| Isopropanol                                     | Baker          |
| Kanamycin                                       | Serva          |
| KCl   | Merck          |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                        | Sigma          |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                        | Sigma          |
| $\text{MgCl}_2$ -Hexahydrat                     | Merck          |
| 2-Mercaptoethanol                               | Serva          |
| Methanol  | Baker          |
| Moviol  | Hoechst        |
| Natriumacetat                                   | Merck          |
| Natriumcitrat                                   | Merck          |
| NaCl z.A.                                       | Merck          |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ z.A. (wasserfrei)     | Merck          |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                       | Baker          |
| NaOH  | Sigma          |
| $\text{NH}_4$ -Acetat                           | Riedel-de-Haën |
| Nickel-NTA-Agarose                              | Qiagen         |
| Paraformaldehyd                                 | Fluka          |
| Pepton aus Casein oder Fleisch                  | Merck          |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung                  | Gibco          |
| pH-Meter Kalibrier-Lösungen (pH 4,0; 7,0; 10,0) | Sigma          |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)              | AppliChem      |
| Polyethylenglykol (8000)                        | Merck          |
| Salzsäure                                       | Baker          |
| Schafblut                                       | Oxoid          |
| SDS   | Fluka          |
| Spectinomycin                                   | Sigma          |
| Stickstoff                                      | Linde          |
| TEMED   | Bio-Rad        |
| Triton X-100                                    | Sigma          |
| Trockenmilchpulver (0,3 % Fettanteil)           | Glücksklee     |
| Todd Hewitt Broth                               | Oxoid          |
| TRIZMA-Base                                     | Sigma          |
| Trypton   | Merck          |
| Tween® 20                                       | Merck          |
| Wasserstoffperoxid                              | Merck          |

Zinksulfat

Sigma

## V. Aminosäuren

|                |     |   |
|----------------|-----|---|
| Alanin         | Ala | A |
| Arginin Arg    | R   |   |
| Asparagin      | Asn | N |
| Asparaginsäure | Asp | D |
| Cystein        | Cys | C |
| Glutamin       | Gln | Q |
| Glutaminsäure  | Glu | E |
| Glycin         | Gly | G |
| Histidin       | His | H |
| Isoleucin      | Ile | I |
| Leucin         | Leu | L |
| Lysin          | Lys | K |
| Methionin      | Met | M |
| Phenylalanin   | Phe | F |
| Prolin         | Pro | P |
| Serin          | Ser | S |
| Threonin       | Thr | T |
| Tryptophan     | Trp | W |
| Tyrosin        | Tyr | Y |
| Valin          | Val | V |

## VI. Abkürzungen

|     |                         |
|-----|-------------------------|
| à   | anti                    |
| Amp | Ampicillin              |
| APS | Ammoniumperoxiddisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat     |
| bp  | Basenpaare              |
| BSA | Rinderserumalbumin      |
| °C  | Grad Celsius            |
| D   | Domäne                  |
| Da  | Dalton                  |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| dH <sub>2</sub> O             | deionisiertes Wasser                     |
| DIF                           | Doppelimmunfluoreszenzfärbung            |
| DIG                           | Digoxigenin                              |
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure                   |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure             |
| EM                            | Elektronenmikroskopie                    |
| Erm                           | Erythromycin                             |
| FCS                           | fötales Kälberserum                      |
| FSC                           | freie sekretorische Komponente           |
| g                             | Gramm                                    |
| h                             | Stunde                                   |
| hplgR                         | humaner polymerer Immunglobulin-Rezeptor |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                       |
| Ig                            | Immunglobulin                            |
| IPTG                          | Isopropylthio-β-galactosid               |
| kb                            | Kilobasenpaare                           |
| kDa                           | Kilodalton                               |
| Konz.                         | Konzentration                            |
| l                             | Liter                                    |
| IgA                           | Immunglobulin A                          |
| LB                            | Luria Bertani                            |
| Lsg.                          | Lösung                                   |
| M                             | molar (mol/l)                            |
| m                             | milli (10 <sup>-3</sup> )                |
| mg                            | Milligramm                               |
| min                           | Minute                                   |
| ml                            | Milliliter                               |
| mM                            | millimolar                               |
| MW                            | Molekulargewicht                         |
| μ                             | mikro (10 <sup>-6</sup> )                |
| μg                            | Mikrogramm                               |
| μl                            | Mikroliter                               |
| n                             | nano (10 <sup>-9</sup> )                 |
| NADH                          | Nikotinamidadenindinukleotid             |
| NaAc                          | Natriumacetat                            |
| nm                            | Nanometer                                |
| OD                            | Optische Dichte                          |

|              |  |
|--------------|--|
| $\Omega$     | Ohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)    |
| PAGE         | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                |
| Pen          | Penicillin                                     |
| pIgA         | polymeres Immunglobulin A                      |
| pIgR         | polymerer Immunglobulin-Rezeptor               |
| RNA          | Ribonukleinsäure                               |
| RNAse        | Ribonuklease                                   |
| rpm          | Runden pro Minute                              |
| RT           | Raumtemperatur                                 |
| SC           | sekretorische Komponente                       |
| SDS          | Natriumdodecylsulfat                           |
| SIgA         | sekretorisches IgA                             |
| <i>S. p.</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                |
| Spec         | Spectinomycin                                  |
| Strep        | Streptomycin                                   |
| TEMED        | Tetramethylethyldiamin                         |
| THY          | Todd Hewitt Broth mit 0,5 % Hefeextrakt        |
| TRIS         | Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan               |
| TRIS-HCL     | Tris- (hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid |
| ü/N          | über Nacht                                     |
| V            | Volt (Einheit der Spannung)                    |
| Vol          | Volumen  |

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. K. N. Timmis für die Möglichkeit, die Doktorarbeit im Bereich Mikrobiologie anfertigen zu können.

Herrn Prof. G. S. Chhatwal danke ich für die Schaffung des wissenschaftlichen Umfelds während der Durchführung der Arbeit in der Abteilung Mikrobielle Pathogenität sowie für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dieter Jahn danke ich für die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Sven Hammerschmidt für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihm für die zahlreichen guten Ideen sowie die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei deren Umsetzung. Des Weiteren danke ich ihm für die sehr schnelle Durchsicht des Manuskripts.

Ein großes Dankeschön gilt Dr. Manfred Rohde sowie Ellruth Müller und Patricia Matzander für die hervorragenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ein besonderer Dank gilt Simone Bergmann und Daniela Pracht, die mich während der Promotionszeit in Braunschweig und in Würzburg begleitet haben. Wir haben so manche Höhen und Tiefen gemeinsam bestritten. Ein großer Dank an die Biozentrologen Astrid Müller, Dagmar Bracht, Daniela Wild und Marleen Seiler, die während der Zeit in Braunschweig für ein besonders schönes Arbeitsklima gesorgt haben. Bedanken möchte ich mich ebenso bei meinen Kollegen aus der Abteilung Mikrobielle Pathogenität an der GBF und ganz besonders bei Katja Mummenbrauer, Oliver Goldmann und Gesa Heuser. Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe in Würzburg mit Christa Albert, Claudia Rennemeier und Nadja Noske für den guten Start am Zentrum für Infektionsforschung.

Dr. Ronald Frank und seinen Mitarbeitern danke ich für die Synthese der Spotmembranen. Des Weiteren danke ich Dr. Werner Tegge für die Synthese der Peptide.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Oskar und Margit Elm, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich in allen Entscheidungen unterstützt haben.